

特別な機能をもつ血液透析器の特徴と評価法

峰島 三千男¹ 川西 秀樹² 田中 賢² 政金 生人²
 土田 健司² 山下 明泰² 友 雅司³ 中元 秀友⁴
 大平 久英⁵ 久保田 昌裕⁶

¹日本透析医学会学術委員会血液浄化の機能・効率に関する小委員会委員長

²同委員 ³同学術委員会委員長 ⁴同理事長

⁵日本医療機器テクノロジー協会透析技術分科会会長 ⁶同委員

特別な機能をもつ血液透析器の定義とその判断基準 峰島三千男, 大平久英

Annex

- A1) 透析膜の生体適合性 川西秀樹
- A2) 生体適合性：*in vitro* 評価法 田中 賢
- A3) 生体適合性：臨床評価マーカー 政金生人
- A4) 生体適合性：透析膜からの溶出物 土田健司
- A5) 透析膜の吸着特性 山下明泰
- A6) 膜吸着性：*in vitro* 評価法 久保田昌裕
- A7) 抗炎症能・抗酸化能 友 雅司

特別な機能をもつ血液透析器の定義とその判断基準

峰島 三千男 大平 久英

はじめに

一般社団法人日本透析医学会は一人ひとりの患者に対し適切な治療ならびに血液浄化器が選択されることを目的に血液浄化器の機能分類を行ってきた¹⁻³⁾。現在は「血液浄化器の機能分類 2013」⁴⁾が同学会の見解となっている。従来の分類と大きく異なる点は「特別な機能をもつ血液浄化器（以下S型）」が新設されたことである。本分類は2016年の診療報酬改定時に実質的に採用されたが、「特別な機能」の考え方をより明確にして欲しいとの意見が会員等から寄せられた。これらの背景の下、本委員会報告では「特別な機能」の定義・範囲や評価法を含む判断基準について言及し、これらを明確にすることを目的とした。

I. S型血液透析器の定義

特別な機能とは具体的には生体適合性に優れる、抗炎症性・抗酸化性を有する、吸着によって溶質除去できるなど、従来の溶質除去能（尿素、 β_2 -MGのクリアランス）と異なる機能と定義されている。すなわち溶質除去よりもその特別な機能によって、一部の患者の病態改善に有効との見地に立っている。

II. S型血液透析器の範囲

2013年に本分類が公開された時点ではethylene vinylalcohol (EVAL[®])膜と polymethylmethacrylate (PMMA)膜血液透析器をS型血液浄化器と明記している。ただし、今後新たに開発される血液透析器についてはそのつど審議するものとしている。

EVAL[®]は構造水を有することから polyvinylpyrrolidone (PVP)などの親水化剤を必要とせず、血漿蛋白の吸着が少ない性質をもつ^{5,6)}。例えば、透析中の経皮酸素分圧 (TcP_{O2})の変化では、改質セルロース (modified regenerated cellulose: MRC)膜やポリスルフォン (polysulfone: PS)膜血液透析器に比べ EVAL[®]膜血液透析器の変動が小さく、患者の微小循

環に及ぼす影響が少ないことが明らかとなっている⁷⁾。さらに血小板の活性化が少なく⁸⁾、好中球の活性化による活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)産生が少ない⁹⁾などの報告がなされ、優れた生体適合性を有する膜であることが明らかとなっている。

PMMAはほぼ均一な対称構造を有することから膜抵抗はやや大きいものの比較的大きな細孔をもち、アルブミンに近い大分子溶質の除去に優れたプロドタイプの分画特性をもつ¹⁰⁾。さらにPVPなどの親水化剤を用いないことから蛋白吸着特性をもち、特に膜透過が困難な大分子溶質の吸着除去を可能としている¹¹⁾。この特有の物質除去特性により、痒痒症の改善や高齢透析患者の体重維持に有効との報告がある¹²⁻¹⁴⁾。

EVAL[®]、PMMA以外の血液透析器で今後新たにS型に分類すべきか否かについて議論する際、そのつど製造販売業者の団体である一般社団法人日本医療機器テクノロジー協会 (Medical Technology Association of Japan: MTJAPAN)に本学会学術委員会血液浄化療法の機能と効率小委員会が協力して審議することになる。しかしながら特別な機能そのものは、牛血系などの *in vitro* 評価ではなく臨床で評価されることが想定される。したがって、新規血液透析器についてはいったんI型、II型血液透析器として分類され、その後の臨床評価を経てメーカーがその意志に基づいてS型に変更申請し、審議を受けることになるものと思われる。

III. S型血液透析器の判断基準

人工腎臓用特定保険医療材料 (ダイアライザ)の機能分類審査は製造販売業者の団体であるMTJAPANの人工腎臓機能分類審査会によって行われている。MTJAPANはS型が新規に導入されたことに鑑み、具体的な審査運営に関する手順書を作成している。なお、本手順書は、人工腎臓用特定保険医療材料の定義が改定された場合、あるいは、血液浄化器の性能評価法が見直された場合などには、その都度、変更されることになる。以下に現在の手順書の抜粋を示す。

IV. 人工腎臓用特定保険医療材料（ダイアライザ）の機能分類審査の運営に関する手順書（抜粋）

1. 本手順書が適用となる範囲

保険適用を希望する製造販売業者は、製造販売を予定するダイアライザの製造販売承認申請の承認後、保険適用希望書を厚生労働省医政局経済課に提出する必要がある。本手順書は、製造販売業者が人工腎臓用特定保険医療材料（ダイアライザ）の保険適用を希望する場合に、保険適用を希望する機能区分に対する該当性の審査を人工腎臓機能分類審査会に依頼する場合の手順（下記概要を参照）を示すものである。なお、S型への適用を希望するダイアライザのうち、膜素材がEVAL[®]またはPMMAであるものにおいては、機能分類審査会の審査を要さないものとする。

2. 申請および審査の手順 A（Ia型・Ib型・IIa型・IIb型への該当性の審査）

(1) 機能分類 [Ia・Ib・IIa・IIb] への該当性の審査を希望する製造販売業者は、製造販売承認申請の承認後、下記の文書をMTJAPANに送付する（図1：⑤）。

- イ ダイアライザ機能分類審査申請書
- ロ 保険適用を希望する製品リスト
- ハ ダイアライザ機能分類データ（提出用）
- ニ ダイアライザ機能分類データ（審査用）

(2) MTJAPANは、送付されたダイアライザ機能分類審査申請書に受付番号を記入後、当該申請書を人工腎臓機能分類審査会委員長に送付する（図1：⑥）。

(3) 人工腎臓機能分類審査会委員長は、審査に必要な文書が揃っていることを確認する。必要な文書が揃っていない場合には、審査申請を行った製造販売業者に対して不足する資料の提出を指示する。

(4) 人工腎臓機能分類審査会委員長は、審査会の日程調整を行い、審査会委員を招集する。

(5) 人工腎臓機能分類審査会は、ダイアライザ機能分類実施マニュアルに従って、審査請求のあったダイアライザの機能分類への該当性を審査する。

(6) 人工腎臓機能分類審査会委員長は、ダイアライザ機能分類審査申請書に判定結果を記入後、MTJAPANに確認（押印）を依頼する（図1：⑨）。

(7) 人工腎臓機能分類審査会委員長は、イ、ロ、ハの原本（厚生労働省医政局経済課宛て封印）とイ

の原本の写し1部を申請者に返却する（図1：⑩）。同時に、ダイアライザ機能分類審査申請の資料イ（押印済の原本の写し）、ロ、ハ、ニの保管をMTJAPANに依頼する。

(8) 製造販売業者（審査申請者）は、ダイアライザ機能分類審査の判定結果（封印されたイ、ロ、ハの原本）を添付して、厚生労働省医政局経済課へ保険適用希望書を提出する（図1：⑪）。

3. 申請および審査の手順 B（S型への該当性の審査）

(1) 機能分類S型への該当性の審査を希望する製造販売業者は、下記の文書をMTJAPANに送付する（図1：⑤）。

- ホ ダイアライザ機能分類審査申請書
- ヘ 保険適用を希望する製品リスト
- ト 「特別な機能を有すること」の理由書およびその根拠となるデータ等

「特別な機能を有すること」については、その機能が当該ダイアライザに固有の機能であることを、学術論文等を根拠となるデータとして客観的に説明する必要がある。このとき用いる学術論文等は、少なくとも下記の要件を満たしていなければならない。

（根拠となるデータとして必要な要件）

- ① 原著論文（受付日と受理日があるもの）で、査読がある論文であること。
- ② 特別な機能を示す例として、臨床研究グループによる学術論文を有し、学術論文の中で、当該ダイアライザと他のダイアライザとの差異が論じられていること。臨床データにおけるこの差異は統計学的有意差をもって示されていること。
- ③ 「特別な機能を有すること」について、上記の臨床データと関連のあるデータ（臨床、非臨床）がある場合には付記できること（これについては社内データ等で可）。
- ④ 「特別な機能」は、文献4に記載されている「生体適合性に優れる」「吸着によって溶質除去できる」「抗炎症性を有する」「抗酸化性を有する」など、従来の溶質除去能（尿素、 β_2 -ミクログロブリンクリアランス）と異なるものを示すこと。

(2) MTJAPANは、送付されたダイアライザ機能分類審査申請書に受付番号を記入後、当該申請書を人工腎臓機能分類審査会委員長に送付する（図1：⑥）。

(3) 人工腎臓機能分類審査会委員長は、審査に必要な

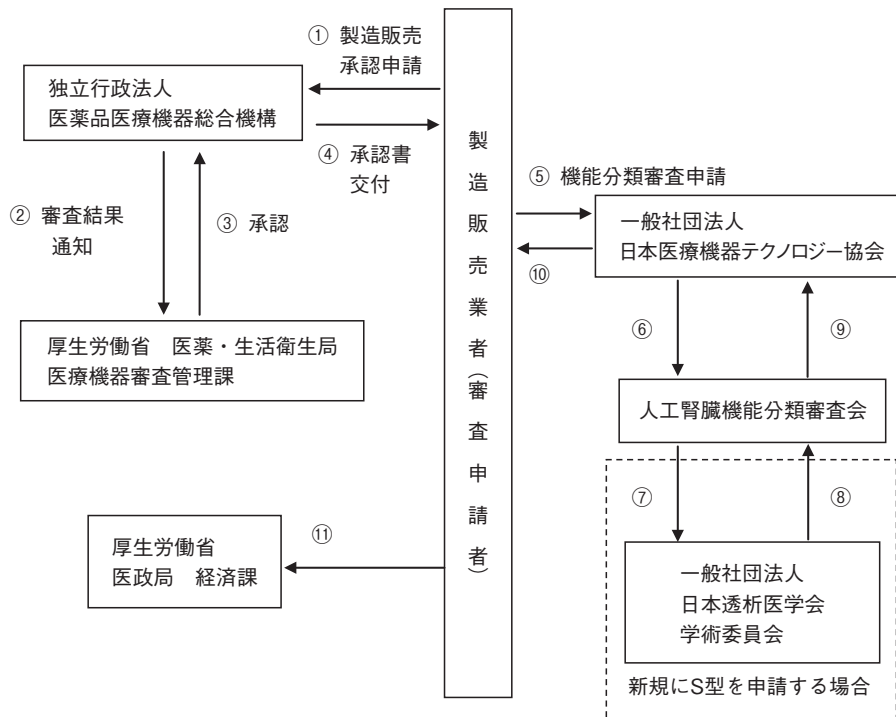


図 1 人工腎臓用特定保険医療材料（ダイアライザ）の保険適用希望書提出のプロセス（概要）

- な文書が揃っていることを確認する。必要な文書が揃っていない場合には、審査申請を行った製造販売業者に対して不足する資料の提出を指示する。
- (4) 人工腎臓機能分類審査会委員長は、審査会の日程調整を行い、審査会委員を招集する。
- (5) 人工腎臓機能分類審査会は、「特別な機能を有することの根拠となるデータ（資料ト）」が「根拠となるデータ等として必要な要件」を満たしていることを確認ののち、資料トを添付して一般社団法人 日本透析医学会 学術委員会（以下学術委員会）に機能分類 S 型への該当性について審議を求め、その審議結果を入手する（図 1：⑦、⑧）。審議を依頼するに際しては、人工腎臓機能分類審査会が審議の依頼を行った後、日本透析医学会理事長に要請を行う。
- (6) 日本透析医学会理事長より入手した審議結果報告書をもとに、機能分類 S 型への該当性を審査する。ただし、学術委員会に審議を求めなくとも機能分類 S 型への該当性が明らかであると判断できる場合には、学術委員会に審議を求めることなく人工腎臓機能分類審査会において審査を終了できる。
- (7) 人工腎臓機能分類審査会委員長は、ダイアライザ機能分類審査申請書に判定結果を記入後、MTJAPAN に確認（押印）を依頼する（図 1：

⑨）。

- (8) ホ、への原本（厚生労働省医政局経済課宛て封印）と原本の写し 1 部を申請者に返却する（図 1：⑩）。同時に、ダイアライザ機能分類申請の資料ホ（押印済の原本の写し）、へ、ト、および学術委員会から受領した審議結果報告書（原本）の保管を MTJAPAN に依頼する。
- (9) 製造販売業者（審査申請者）は、ダイアライザ機能分類審査の判定結果（封印されたホ、への原本）を添付して、厚生労働省医政局経済課へ保険適用希望書を提出する（図 1：⑪）。

おわりに

特別な機能をもつ血液浄化器（S 型）の定義、範囲、判断基準について述べた。その定義で規定されている、生体適合性に優れる、抗炎症性・抗酸化性を有する、吸着によって溶質除去できるなど、従来の溶質除去能（尿素、 β_2 -MG のクリアランス）と異なる機能については、Annex にまとめた。

本報告の発行により、「特別な機能」に対する正しい理解が深まり、そのことが新規の血液浄化器の開発につながり、透析患者によりよい福音となることを切に望む次第である。

文献

- 1) 佐藤威, 斎藤明, 内藤秀宗, 他. 報告 各種の血液浄化法の機能と適応—血液浄化器の性能評価法と機能分類. 透析会誌 1996; 29: 1231-45.
- 2) 川口良人, 斎藤明, 内藤秀宗, 金成泰, 峰島三千男. 血液浄化器の新たな機能分類—血液浄化法, 適応との対応. 透析会誌 1999; 32: 1465-9.
- 3) 川西秀樹, 峰島三千男, 竹澤真吾, 他. 新たな透析液水質基準と血液浄化器の機能分類. 透析会誌 2005; 38: 149-54.
- 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 2013. 透析会誌 2013; 45: 435-45.
- 5) Bonomini M, Pavone B, Sirolli V, et al. Proteomics characterization of protein adsorption onto hemodialysis membranes. *J Proteome Res* 2006; 5: 2666-74.
- 6) 石田正夫. エチレンビニルアルコール共重合体透析器の血液適合性. *細胞* 2005; 37: 30-4.
- 7) 佐藤元美, 依馬弘忠, 森田弘之, 天野泉. 透析膜の微小循環系への影響とその解析. *腎と透析* 2003; 55 別冊: 183-6.
- 8) Itoh S, Suzuki C, Tsuji T. Platelet activation through interaction with hemodialysis membranes induces neutrophils to produce reactive oxygen species. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77: 294-303.
- 9) Sirolli V, Ballone E, Amoroso L, et al. Leukocyte adhesion molecules and leukocyte-platelet interactions during hemodialysis: effects of different synthetic membranes. *Int J Artif Organs* 1999; 22: 536-42.
- 10) Sakai Y, Tsukamoto H, Fujii Y, Tanzawa H. Formation of poly(methylmethacrylate) membranes utilizing stereocomplex phenomenon. In: Cooper AR, ed. *Ultrafiltration Membranes and Applications*. New York: Plenum Publishing, 1980: 99-107.
- 11) 菅谷博之, 上野良之, 山田智子, 板垣一郎. ハイパフォーマンス・メンブレンの構造と機能. *腎と透析* 2006; 61 別冊: 19-23.
- 12) Kato A, Takita T, Furuhashi M, et al. Polymethylmethacrylate efficacy in reduction of renal itching in hemodialysis patients: crossover study and role of tumor necrosis factor- α . *Artif Organs* 2001; 25: 441-7.
- 13) Lin HH, Liu YL, Liu JH, et al. Uremic pruritus, cytokines, and polymethylmethacrylate artificial kidney. *Artif Organs* 2008; 32: 468-72.
- 14) Masakane I. High-quality dialysis: a lesson from the Japanese experience. *Nephrol Dial Transplant Plus* 2010; 3(Suppl. 1): i28-35.

Annex

ここでは特別な機能と定義されている，生体適合性に優れる，抗炎症性・抗酸化性を有する，吸着によって溶質除去できるなどの機能の具体的な考え方について以下に記述する。

A1) 透析膜の生体適合性

川西 秀樹

はじめに

透析療法は合成材料に血液を接触することにより、尿毒症性物質を除去することで成り立っている。そのため異物への接触は避けることができず必然的に血液反応が惹起される。つまり常に生体非適合性 (bioincompatible) な状態にある。

特に透析器は接触面積が大きいため反応の主要な場となり、またファイバ内部で濾過や逆濾過が起こり圧の変化によるストレスや透析液よりの流入物質や配管系の汚染より影響を受ける。そのため生体適合性の影響する大きな因子としては、材料 (透析膜) との接触による反応と、透析液による反応、汚染物質による反応、内圧、流速による反応を考えなければならない (表 A1-1)。

I. 透析膜との接触による反応

血液透析膜と血液接触による相互作用としては多くが示されている¹⁾。

1. 補体系反応

最も直接的な反応は、補体と白血球の反応による白血球減少と肺胞内への白血球の集簇である。透析療法初期には、ENKA 社が開発したセルロースを原材料とする再生セルロース (regenerated cellulose: RC) 膜を使用した場合に血圧低下と一過性の白血球減少が起こり、過敏性症候群や first use 症候群として研究されていたが²⁾、Craddock ら³⁾が 1977 年にこれに補体の第二経路活性化が関与している事実を見出して以来、RC 膜の詳細な補体活性化機序が明らかにされた⁴⁻⁷⁾。

RC 膜表面に存在する補体活性基である遊離-OH 基により補体が活性化され、生体に強力な作用を有するアナフィラトキシンである C3a と C5a が産生される。この活性化補体は顆粒球を刺激し接着分子が発現し血管内皮細胞への接着遊走が起こり、肺胞内へ白血球が集簇し全身白血球減少が起こる。この補体活性化には-OH 基の数、膜の陰性荷電や親水性の程度、-OH 基への蛋白吸着性などが規定因子となる。

表 A1-1 透析膜と血液接触による相互作用

- | |
|---|
| 1. 透析膜との接触 |
| ・補体系反応：アナフィラトキシン (C3a と C5a) 産生
平滑筋収縮, 血管透過性亢進, 肥満細胞よりのヒスタミン遊離, 活性酸素産生, アラキドン酸代謝促進, 単核球刺激によるサイトカイン産生 |
| ・血小板凝集 |
| ・顆粒球活性化 |
| ・単核球反応
サイトカインの過剰産生 |
| 2. 透析液・汚染の影響 |
| ・酢酸 |
| ・汚染物質 (エンドトキシン, DNA fragments) |
| ・透析配管系細菌汚染 |
| 3. 内圧, 流速による反応 |

補体活性化には過敏性症候群の原因ばかりでなく、好中球やリンパ球、単核球刺激、活性酸素が産生を介して免疫能低下、透析アミロイドーシスや動脈硬化などの長期的透析合併症の促進因子となる。

このように RC 膜による補体系活性化機序が透析膜による生体反応解明の第一歩であり、これを契機として透析膜素材の開発が進行した。

その後、この-OH 基を修飾した改質セルロース系膜が開発され、polyethylene glycol (PEG)、ビタミン E や diethylaminoethyl (DEAE) が修飾材として用いられた。そのほか-OH 基を酢酸に置き換えた酢酸セルロース膜があり、その中には cellulose diacetate (CDA) と cellulose triacetate (CTA) 膜がある。このようにセルロース系膜の生体適合性は改善してきており、とくに CTA 膜は合成高分子膜と引けを取らない生体適合性を有している。

2. 陰性荷電膜症候群 (カリクレイン・キニン系)

透析により凝固系の亢進とともにカリクレイン・キニン系が活性化することはよく認識されていたが、臨床的生体反応として明らかとなったのは陰性荷電膜 (ポリアクリルニトリル (PAN-AN69) 膜) とアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (angiotensin converting enzyme inhibitor: ACEI) との相互作用による^{8,9)}。どのような透析膜でも反応は起こりうるが、とくに PAN-AN69 膜、や low density lipoprotein (LDL) 吸着に用いられるデキストラン硫酸セルロースビーズ¹⁰⁾

を使用すると、陽性荷電因子であるプレカリクレイン、第XI因子、第XII因子、高分子キニノーゲンなどが膜表面上で反応を起こし、ブラジキニンが産生される。通常はキニナーゼI、IIによりブラジキニンは不活性化される。このキニナーゼIIはアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme: ACE) と同じものであり、ACEIはキニナーゼII (ACE) の作用を阻害するため同時に使用するとブラジキニンの不活化抑制が起こり、血圧低下、胸部症状、気道粘膜腫脹による呼吸困難、痺れ (口唇、舌、四肢など)、悪心、嘔吐、下痢などの症状をひき起こす。抗凝固薬としてメシル酸ナファモスタットを用いるとカリクレイン・キニン系活性化が抑制されるため生体反応は抑制される。

3. 血小板一好中球反応

透析膜との接触により活性化された血小板は、膜や回路表面に粘着、凝集し凝集塊を形成して血栓形成を発する。さらにアラキドン酸カスケードを活性化してプロスタノイドを産生、また β -トロンボグロブリン (β -TG) や血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) などの産生・放出を促す。こうした血小板の活性化は陽性荷電膜で強く、また補体活性化の影響も関与する。

また透析膜との接触により血小板が活性化し、顆粒球内に駐留していた接着分子であるP-セレクトリンが細胞表面に移動発現し、好中球表面の糖鎖リガンドであるP-セレクトリンリガンドと結合する。これにより血小板一好中球複合体が形成、好中球内にシグナルが伝達され活性酸素やサイトカインなどを誘導する¹¹⁾。

4. インターロイキン仮説 (単核球反応)

1983年、Hendersonらによってインターロイキン仮説が提唱された¹²⁾。それはRC膜との接触により単核球が活性化され、IL-1の産生・分泌が亢進して、短期および長期的な透析合併症を生じる可能性があるとした。その後、単核球からIL-1以外にIL-6、IL-8、tumor necrosis factor (TNF) などの炎症性サイトカインが産生されることが証明され、さらに透析膜への接触だけでなく、透析液中の酢酸や汚染物質 (エンドトキシンなど) が影響を及ぼすことが示された。

とくに汚染された透析液中に存在するエンドトキシンは強力なサイトカイン産生刺激となる。しかし当初はたとえ汚染された透析液を使用したとしてもダイアライザ自体が汚染阻止フィルタとして働き、生体内へは影響しないと考えることが一般的であった。この考えを否定するためにKochらのグループは *in vitro* 実験を繰り返し、どのような種類のダイアライザであっ

ても汚染物質が透過し血液側にサイトカインを遊離させることを証明した。特にLonnemannらは膜細孔系の小さなRC膜と透過性の向上したPS膜、ポリアミド膜、ポリアクリロニトリル膜、セルローストリアセテート膜を比較し、RC膜ではサイトカインの遊離が大きく、特に膜厚の薄いものほど顕著であることを示した¹³⁾。これは汚染物質の透過性は単に細孔系に比例するのではなく、膜材質によって異なり、特にPS膜のように吸着能力を有している膜種では阻止ができることによっている。また、この結果はlow-fluxダイアライザ (セルロース系) 使用時においても透析液清浄化が必要であることを示唆するものである。しかしPS膜でもサイトカインは遊離されており、特に最近のPS膜の物質透過性は極度に向上しているため透析液の清浄化は必須である。またEvansらは同様の実験系で腸内菌と緑膿菌の刺激性を比較し、緑膿菌ではたとえET濃度が低くてもサイトカイン遊離は大きいことを示した¹⁴⁾。透析液中の細菌の大半は緑膿菌属であり、この実験より低いET濃度であっても細菌汚染は避けなければならないことが証明された。

また、ETよりさらに微小な物質である細菌のDNA fragments (Oligodeoxynucleotides, 6-20 核酸, 1,200~25,000 Da) の流入が懸念されている¹⁵⁾。これは大半のダイアライザを素通りするものであり、これを制御するためには完全な透析液清浄化が必要となる。

このインターロイキン仮説は後にMalnutrition Inflammation and Atherosclerosis syndrome (MIA 症候群)¹⁶⁾へ発展し、透析療法合併症の中心としてサイトカインに代表されるメディエーターを位置づけ、炎症・低栄養・動脈硬化の3者が密接に結びついて種々なる合併症をひき起こし、生存率を低下させるとした。

II. 合成高分子膜、親水化剤による生体反応

RC膜に変わる素材として、物質透過性と生体適合性に優れるとされる合成高分子膜の開発が1980年代後半より行われ、90年代前半までに現在用いられている大半の膜素材が市場に出てきた。代表的なものは1985年にStreicherとShneiderらにより開発されたポリスルホン膜 (PS, Fresenius) であり、その後ポリカーボネート膜、ポリアクリロニトリル膜 AN69-PAN (Hospal), PAN-DX (旭化成), SPAN (Akzo), ポリエステル系ポリマーアロイ膜 (PEPA, 日機装), ポリアミド (PA, Gambro) などが開発された。PS, PA, PEPAなどの合成高分子膜はもともと疎水性材料であり、透析膜として用いるためには開孔剤・親水

化剤としてポリビニールピロリドン (polyvinylpyrrolidone: PVP) の混入が必須であり、開発当初よりこの含有される PVP 量により補体活性が起こることが懸念されていた¹⁷⁾。

この PS 膜による生体反応については、1997 年ごろに旭化成と東レの PS 膜ダイアライザが市場に出た直後にアナフィラキシー様反応が頻発し、本邦で注目を浴びることとなった^{18,19)}。症状は透析開始直後に血圧低下、激しい場合には気道浮腫をきたし呼吸困難が生ずるものであった。とくに個体差があり特定の症例ではどのメーカーの PS 膜を使用しても同様の症状の発生がみられた。当初は分画分子量を大きくした膜であったため汚染された透析液からエンドトキシンが流入して生体反応をひき起こすとの説が検証された²⁰⁾。しかし完全に透析液清浄化を達成しオンライン HDF を実施している施設においても発生がみられ、また同時に透析したすべての症例に発するわけではなく特定の症例に限定されていた。その後メーカーによるダイアライザの改良 (PVP 分布・固定化の修正?) によりこのようなアレルギー反応の報告は減少した。現時点でもメーカーよりの公式見解は示されていないが PVP を原因とする一種のアレルギー反応であると推察される。最近でもまれではあるが PS 膜使用時には同様の症例がみられることがあり正式な検証が待たれる。また PVP の慢性毒性についても未だ明確な証明はなされていない。

合成高分子膜の中でエチレンビニールアルコール共重合体膜 (EVAL[®]) とポリメタクリレート膜 (PMMA) は親水素材であり、PAN 膜は表面に親水性材料を重合しており、これらは PVP を用いていない。これらのダイアライザは PVP 非含有ダイアライザとしての位置づけがなされる。さらに PVP 含有ダイアライザ表面に別の親水化剤を付与し生体適合性の向上を図る手法も行われている (東レ NV シリーズ)。さらに特殊な方法として、MRC や PS 膜にビタミン E を疎水結合させたビタミン E 固定化膜があり、ビタミン E の抗酸化作用を用いることで生体適合性を向上させている。

Ⅲ. 透析膜自体への吸着による生体適合性

生体適合性合成膜として最初に世に出た PAN-AN69 膜は、それ自体は補体活性をひき起こし C3a と C5a を産生する。しかしこれらは陽性荷電を有しており陰性荷電膜である PAN-AN69 に吸着され結果として生体反応を予防している²¹⁾。同様に PMMA や PEPA 膜も吸着能を有しており、IL-1, IL-6, IL-8,

complement factor D などの反応物質を吸着することで生体適合性を高めている。

文献

- 1) Hakim RM. Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility. *Kidney Int* 1993; 44: 484-94.
- 2) Ing TS, Daugirdas JT, Popli S, et al. First-use syndrome with cuprammonium cellulose dialyzer. *Int J Artif Organs* 1983; 16: 235-9.
- 3) Craddock PR, Hammerschmidt D, White JG, et al. Complement (C5-a)-induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. *J Clin Invest* 1977; 60: 260-4.
- 4) Arnaout MA, Hakim RM, Todd RF, Dana N, Colten HR. Increased expression of an adhesion-promoting surface glycoprotein in the granulocytopenia of hemodialysis. *N Engl J Med* 1985; 312: 457-62.
- 5) Cheung AK, Chenoweth DE, Otsuka D, Henderson LW. Compartmental distribution of complement activation products in artificial kidneys. *Kidney Int* 1986; 30: 74-80.
- 6) Combe C, Pourteu M, de Précigout V, et al. Granulocyte activation and adhesion molecules during hemodialysis with cuprophane and a high-flux biocompatible membrane. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 437-42.
- 7) Descamps-Latscha B, Goldfarb B, Nguyen AT, et al. Establishing the relationship between complement activation and stimulation of phagocyte oxidative metabolism in hemodialyzed patients: a randomized prospective study. *Nephron* 1991; 59: 279-85.
- 8) Tielemans C, Madhoun P, Lenaers M, Schandene L, Goldman M, Vanherweghem JL. Anaphylactoid reactions during hemodialysis on AN69 membranes in patients receiving ACE inhibitors. *Kidney Int* 1990; 38: 982-4.
- 9) Verresen L, Fink E, Lemke HD, Vanrenterghem Y. Bradykinin is a mediator of anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 membranes. *Kidney Int* 1994; 45: 1497-503.
- 10) Olbricht CJ, Schaumann D, Fischer D. Anaphylactoid reactions, LDL apheresis with dextran sulfate, and ACE inhibitors. *Lancet* 1992; 340: 908-9.
- 11) 伊藤佐生智, 辻勉. 透析膜による血液細胞の活性化と細胞接着. 内藤秀宗監修. 透析膜の生体適合性. 血液, 東京: 東京医学社, 2010; 48-57.
- 12) Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S. Hemodialysis hypotension: the interleukin-1 hypothesis. *Blood Purif* 1983; 1: 3-8.
- 13) Lonnemann G, Behme TC, Lenzner B, et al. Permeability of dialyzer membranes to TNF alpha-inducing

- substances derived from water bacteria. *Kidney Int* 1992; 42: 61-8.
- 14) Evans RC, Holmes CJ. In vitro study of the transfer of cytokine-inducing substances across selected high-flux hemodialysis membranes. *Blood Purif* 1991; 9: 92-101.
- 15) Schindler R, Beck W, Deppisch R, et al. Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 3207-14.
- 16) Stenvinkel P. Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient. *Blood Purif* 2001; 19: 53-61.
- 17) Ward RA, Klein E, Harding GB, Murchison KE. Response of complement and neutrophils to hydrophilized synthetic membranes. *ASAIO Trans* 1988; 34: 334-7.
- 18) 中西浩次, 松下健一, 田中隆, 佐古守, 村田環. APS150 (旭メディカル社製) 使用によりアナフィラキシー様症状を来したと考えられる1例. *臨床透析* 1997; 105: 505-8.
- 19) 中西浩次, 松下健一, 田中隆, 佐古守, 村田環. BS-1.6 使用によるアナフィラキシーショックの経験. *腎と透析* 1997; 42: 255-8.
- 20) 藤森明, 内藤秀宗, 鈴木正司, 秋澤忠男, 他. ポリスルフォン膜におけるアナフィラキシー様反応に関する一考察. *腎と透析 別冊ハイパフォーマンスメンブレン* 1999; 99: 163-6.
- 21) Pascual M, Schifferli JA. Adsorption of complement factor D by polyacrylonitrile dialysis membranes. *Kidney Int* 1993; 43: 903-11.

A2) 生体適合性：in vitro 評価法

田 中 賢

はじめに

次世代の血液透析器の開発には、血液透析器を構成する材料の表面と血液が接触する界面において、異物反応を小さくする技術が求められる。このような技術を開発するためには、材料が血液に接触した際に引き起こされる初期現象の分子レベルでの理解が不可欠である。本稿では、材料-血液間相互作用を理解するための *in vitro* 評価法について述べる。

I. 血液透析器の表面で起こる現象

血液透析器を構成する材料が血液に接触すると、はじめに起こる現象は血液に含まれる水分子やイオンの基材表面への吸着である（図 A2-1）。材料の表面は数秒から数分のうちに飽和含水状態になる¹⁻³⁾。ついで、アルブミン、フィブリノーゲンなどの蛋白質が材料表面と相互作用し吸着する。吸着した蛋白質は、徐々に構造変化を起こし、吸着したフィブリノーゲン

は血小板粘着部位を露出する。材料表面に吸着した蛋白質の量・組成・構造・分布・凝集構造は時々刻々と変化する。血球細胞は、細胞膜表面受容体を介して、吸着したフィブリノーゲンの構造変化により露出した細胞接着部位（ γ 鎖）を認識して接着する。接着後、認識した蛋白質の種類や量に応じて異なった細胞内のシグナル伝達経路の活性化が起こる。つまり、吸着蛋白質の状態に応じて血球細胞の初期接着状態が変化する。細胞の初期接着形態や接着機構に応じて材料-血球細胞間相互作用が変化し、血液透析性能に影響する。血液の最大成分である水分子は、蛋白質の吸着や血栓形成の場を提供している。したがって、この水分子の構造や運動性が血液透析性能に大きな影響を与えると考えられる。

II. 蛋白質の吸着現象—吸着と構造変化

これまでに、材料表面への吸着蛋白質の解析法として、免疫電気泳動、酵素結合免疫吸着法（enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA）、マイクロピ

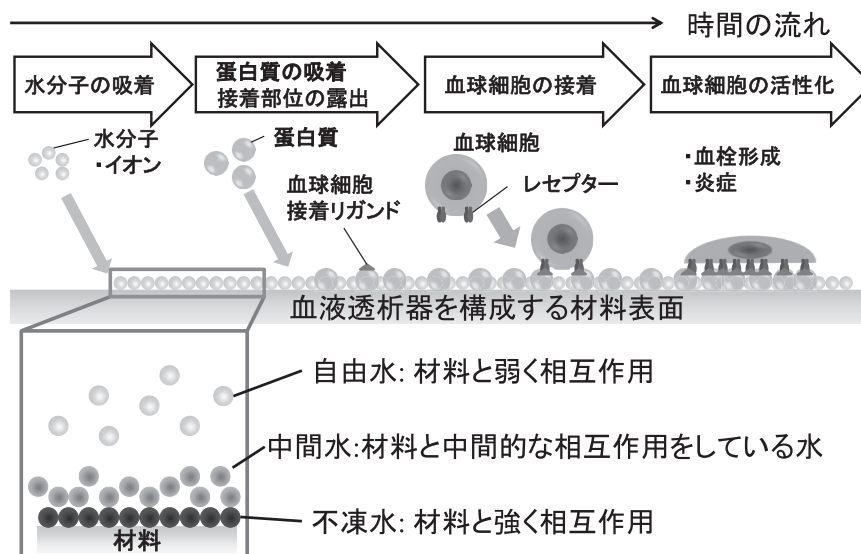


図 A2-1 材料と血液の界面における蛋白質の吸着・細胞接着状態の時間変化
最初に起こるイベントは、血液に含まれる最大成分である水分子の吸着である。材料に血液の水が吸着すると、運動性が高く自由に動き回る“自由水”と、材料に強く結合する“不凍水”に分かれる。さらに、材料の種類によっては、自由水と不凍水の中間の性質を示す“中間水”が出現する。

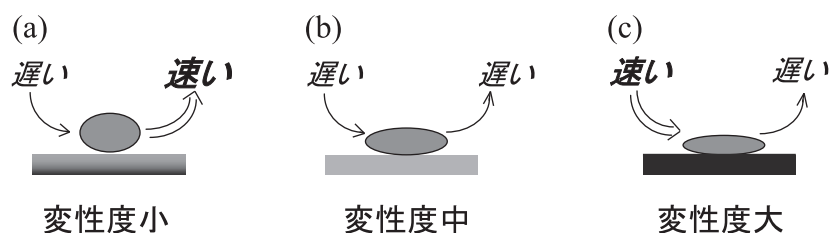


図 A2-2 生体適合性に影響する蛋白質の吸着・脱離と構造変化

(a) k_f の値が小さく、 k_{-f} の値が大きい場合：蛋白質吸着が起りにくく、吸着した蛋白質が脱離しやすい基材。吸着した蛋白質の変性はほとんど起こらない。

(b) k_f と k_{-f} がともに比較的小さい場合：蛋白質吸着は起りにくいものの、吸着した蛋白質が少し変性することにより、吸着蛋白質の脱離が比較的起りにくい。

(c) k_f の値が大きく、 k_{-f} の値が小さい場合：蛋白質の吸着が起りやすく、吸着した蛋白質の変性が大きい基材。吸着した蛋白質が大きく変性するので、吸着蛋白質の脱離が起りにくい。

シンコニン酸 (μ BCA) 法, 赤外分光, 円偏光二色 (CD) 分光, 表面プラズモン共鳴, 水晶発振子マイクロバランス (quartz crystal microbalance: QCM), 走査型原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM), プロテオミクスなどが知られている。

例えば, 動的な解析法である QCM 法によりアルブミンやフィブリノーゲンの材料に対する動的吸着挙動 (吸着速度定数 (k_f) および脱離速度定数 (k_{-f})) が調べられている¹⁻³⁾。材料の種類によって, k_f と k_{-f} が大きく異なることがわかった。図 A2-2 に 3 種類のパターンを示す。 k_f の値が大きい場合は, 蛋白質の吸着が起りやすい材料であり, k_f の値が小さい場合は, 蛋白質吸着が起りにくい材料であることを示している。一方, k_{-f} の値が大きい場合が, 吸着した蛋白質が脱離しやすい材料であり, k_{-f} の値が小さいケースは, 吸着した蛋白質が脱離しにくい材料であることを示している。

材料-蛋白質間の相互作用が小さいほど, 吸着蛋白質の構造変化が小さくなり, 脱離しやすいことがわかった。このような材料には, 細胞の接着が起りにくいことがわかっている。一方, 材料-蛋白質間の相互作用が大きいほど, 吸着蛋白質の構造変化が多くなり, 細胞接着のリガンドとなるアミノ酸配列が露出することで, 細胞接着が起りやすくなる。

AFM を用いて材料-蛋白質間に作用する接着力の測定がさまざまなイオン濃度, pH 条件で行われている。材料-蛋白質間の相互作用が弱いケースは, 疎水性相互作用, 静電相互作用では説明できず, 材料表面および蛋白質表面の物理化学的な物性や水分子が重要な役割を果たしていることが示唆されている¹⁻³⁾。

これまでに, 材料表面に吸着する蛋白質の状態に影響する因子として, 材料表面の電荷, 濡れ性, 表面自由エネルギー, 特異的な官能基の影響などが指摘され

表 A2-1 生体適合性に影響する材料の物理化学物性の例

- 1) 親水性・疎水性
- 2) 電荷 (正・負・中性: ノニオン, 両性イオン)
- 3) 粘弾性 (硬さ, 柔らかさ)
- 4) 高分子の主鎖・側鎖の分子運動性
- 5) 結晶性・非晶性
- 6) 分子配向性・立体規則性
- 7) 表面微細形状 (ナノ・マイクロ)
- 8) 分子量・分子量分布
- 9) 水和状態 (飽和含水量・組成)

* 乾燥時, 含水時 (低含水量から飽和含水量)

** 表面近傍, バルク

ている (表 A2-1)¹⁻³⁾。一方, 材料表面が血液と接触すると蛋白質が吸着する前に, 水が吸着する¹⁻³⁾ (図 A2-1)。上述の材料表面のさまざまな物理化学物性が, 材料表面や内部での水の組織化構造に影響を及ぼすと考えられる。しかし, 材料と蛋白質の界面に存在する水の構造と機能との相関関係については, 多くの実験や理論計算が行われてきているもののいまだに不明な点が多い。

III. 材料に含水した水の状態の解析

材料に含水した水の構造の評価方法として, 材料に吸着した水の構造の評価法として, 示差走査熱量 (differential scanning calorimeter: DSC) 法, 核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance: NMR) 法, 誘電緩和法, 振動分光法 (赤外, ラマン, 和周波発生), X 線回折法, 中性子散乱法などが知られている。

例えば, 含水した状態の poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) の DSC 測定を行った結果, 昇温過程において水の低温結晶形成に由来する発熱ピークおよび氷の低温融解に由来する吸熱ピークが観測された⁴⁻⁶⁾。一方, 水 (純水) のみを DSC 測定した場合,

表 A2-2 材料に含水した水の分類

水の分類	不凍水	中間水	自由水
	<i>Tightly bound water/ Non-freezing bound water</i>	<i>Loosely bound water/ Freezing bound water/ Intermediate water</i>	<i>Scarcely bound water/ Freezing water/ Free water</i>
生体高分子 (蛋白質, 糖類, 核酸など)	+	+	+
合成高分子	生体適合性あり	+	+
	生体適合性なし	-	+
温度変化による 相転移特性	0°C以下で 凍結しない	0°C以下で 凍結する	0°Cで 融解する
固体 NMR 測定による 水分子の緩和時間 τ_c (s)	$10^{-8} \sim 10^{-6}$	$10^{-10} \sim 10^{-9}$	$10^{-12} \sim 10^{-11}$
ATR-IR 測定による 水分子の OH 伸縮振動 (cm^{-1})	3,600	3,400	3,200
高分子鎖への結合力	強	中	弱

中間水は、高い分子運動性を有する材料に弱く束縛され、低温下でも分子運動性の高い水であり、材料表面にも安定に存在する。生体適合性に優れた材料（生体高分子と生体適合性合成高分子）には共通して中間水が観測されることがわかる。

含、昇温過程において、降温時に凍結した水の融解ピークのみが0°Cで観測された。含水量とDSCによる各転位における熱量から、材料中に存在する水を①自由水、②中間水、③不凍水に分類した(表A2-2)。ここでは、自由水は、0°C付近で融解する水、中間水は、低温結晶形成し、かつ低温融解する水、不凍水は、-100°Cにおいても凍結しない水とそれぞれ定義した(表A2-2)。なお、中間水は純水で含水させた材料のみならず、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)や血液に接触させて含水させた材料からも同様に検出された。

材料設計においては、材料の表面と生体成分との相互作用の理解が重要である。DSCは高分子全体に含水した水の状態を測定しているの、材料表面の水の状態についても調べる必要がある。液適法により測定した水の静的接触角は材料の表面構造や表面自由エネルギーに依存するので、高分子表面の水の静的接触角とDSC測定から得られた水の状態(不凍水、中間水、自由水)との相関関係が報告されている⁶⁾。不凍水と中間水量の合計を結合水と定義した接触角と自由水、結合水との相関関係を調べたところ、接触角は、自由水に比べて結合水のほうが、良好な直線関係があることが明らかになった。これは、材料中の結合水量(不凍水+中間水)が接触角の値を決めていることを示唆する。つまり、自由水はバルク水と同様の構造をとっているため、結合定数が小さく交換しやすいが、中間水は材料表面に安定に存在していることを示唆している。

AFMを用いたフォースカーブ測定により、材料と蛋白質間に作用する力について調べた⁷⁾。材料表面と

AFMの探針をPBS中で接近させた際に生じる力を評価した結果、材料に対して疎水性相互作用や静電相互作用とは異なる反発力が働くことがわかった。また、疎水性相互作用や静電相互作用とは異なる反発力の物理的起源を探るため、水分子間の水素結合の3次元ネットワークが弱められた水-エタノール溶媒中で測定を行った結果、PBS中で観測された反発力は観測されないことを見出している。以上の結果から、バルクとは異なる材料の最表面に存在する2~3nmの水のバリア層(水和層)がその反発力を生じさせている可能性が示されている。また、この結果から、材料の最表面に存在する水の水和層(中間水によるバリア層)が蛋白質の吸着に大きく影響していると考えられる。

この中間水は生体適合性に優れている、ヘパリン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、などの多糖、ゼラチンやアルブミンなどの蛋白質、デオキシリボ核酸、リボ核酸などの核酸、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリメチルビニルエーテル、ポリオキサゾリン、ポリホスファゼン、リン脂質(ホスホベタイン)高分子⁸⁾、スルホベタインやカルボベタインなどの正電荷と負電荷を一分子中に有する両性イオン型高分子、すでに医療機器に使用実績のあるコーティング材、新規に合成した生体適合性高分子などに共通して観測された。一方、生体適合性が劣る材料には、中間水は認められなかった。以上の結果から、中間水の存在が生体適合性発現のキーポイントになると推察された。

また、固体NMR(²H NMR, ¹³C NMR)測定の結果、PMEA中の水は材料と相互作用しているにもかかわらず

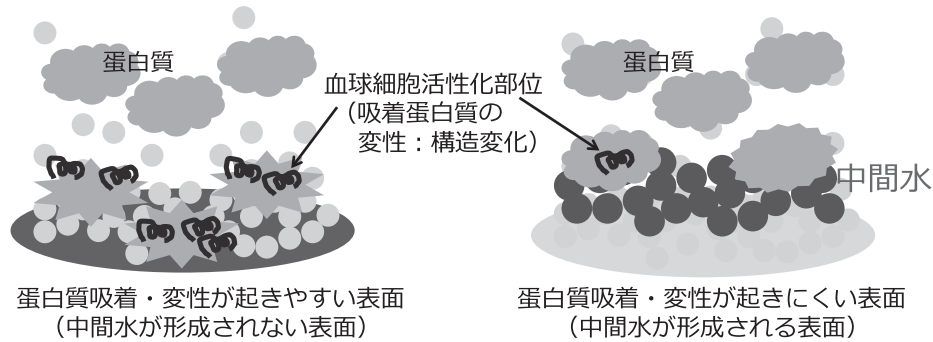


図 A2-3 蛋白質吸着・変性における中間水の役割
 中間水は、材料と蛋白質の間に安定に存在し、中間水量に応じて蛋白質の吸着量や変性度が変化する。

わらず分子運動性が非常に高い特徴を有していることがわかった⁹⁾(表 A2-2)。一方、生体適合性に劣る材料に含水した水の分子運動性は、含水率や温度に依存して大きく変化する。含水率が低く、測定温度が低いほど水の分子運動性が低いことがわかった。また、同様の含水率ではPMEA中の水の運動性が高いことが示された。これらのことから、生体適合性発現には、中間水の役割が重要であることが推定された。また、水の分子運動性を支配する駆動力のひとつは材料の分子運動であり、これに吸着した水は材料との協同運動をしていると考えられる。すなわち、生体適合性発現には材料そのものの分子運動性も大きくかかわっていることが推定された。

さらに、時間分解赤外分光 (*in situ* ATR-IR) 法により、PMEAの官能基レベルでの水和構造が明らかになった^{10,11)}。O-H伸縮振動領域には、不凍水、中間水、自由水に帰属されるバンドが、それぞれ異なる水の吸着時間で観察された。吸着初期では、PMEA側鎖カルボニル基の水素結合バンドがあらわれ、不凍水はカルボニル基と水素結合していることがわかった。吸着中期では、側鎖末端メトキシ基に帰属されるO-CH₃由来のバンドにシフトがみられたことから、中間水は側鎖末端メトキシ基と相互作用していることがわかった。吸着後期では、バルク水と類似した水素結合構造をもつ水が吸着しており、自由水の吸着が示唆された。また、吸着中期でみられた3,400 cm⁻¹付近のバンドは、自由水ほど大きなクラスターではないが、不凍水ほど孤立していない中間的な大きさの水和構造を示していると考えられる(表 A2-2)。

IV. 材料表面に存在する中間水の役割

生体を構成しているすべての物質は水和することで機能を発現できる。生体表面・界面は、多彩な生体反

応が進行する反応場であり、表面・界面の水分子はその重要な構成要素の一つである。血液中の蛋白質や細胞は不凍水、中間水、自由水からなる水和殻をもち、この水和構造によって安定に存在できることが知られている¹⁻³⁾。生体成分は血液中で水和殻を形成し安定化されているが、材料表面の不凍水などが直接この水和殻に接触し、これを攪乱あるいは破壊すると、生体成分の材料表面への吸着・活性化の引き金となる(図 A2-3)。自由水は、材料との相互作用が弱く自由に動き回るので不凍水を被覆する役割を果たせないと考えられる。事実、材料表面の自由水は血液のような高塩濃度溶液中では、脱離しやすいのに対して中間水は安定に存在できることが知られている¹¹⁾。

生体適合性材料では、中間水が生体成分の水和殻と材料表面の不凍水の間が存在し両者が直接接触することを阻害するため、異物反応が起きないと考えられる。また、中間水は生体成分の水和殻を破壊するほどの特異な水素結合構造は有していないものの、高い分子運動性を有する材料と特定の分子間力で相互作用した水なので、材料表面に安定に存在できると考えられる。材料の運動性と高分子と水の分子間相互作用とのバランスにより、飽和含水量に対する中間水の割合と量が決定される可能性がある。

V. 生体適合性材料の分子設計

含水した材料に形成される中間水は、生体適合性材料の共通点である。精密有機合成化学の技術を駆使することで、合成高分子の主鎖・側鎖の化学構造を系統的に変化^{12,13)}(図 A2-4) させることで可能である。含水時の高分子主鎖・側鎖の分子運動性と水分子との結合力を制御することで、中間水量を変化させることができる。新規に合成した高分子においても中間水量と生体適合性に強い相関性が認められた。

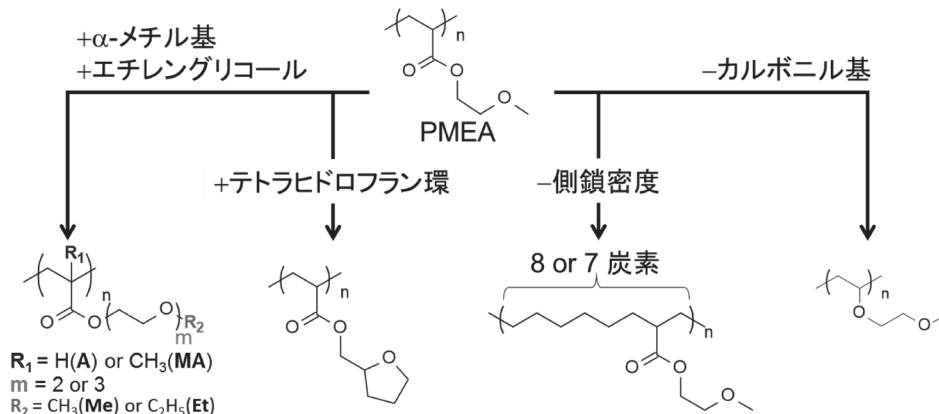


図 A2-4 材料の水和構造制御のための分子設計技術の例

これまでに知られている生体適合性材料は、蛋白質の吸着・変性や血球細胞接着が引き起こされない性質を示すものであったが、PMEA およびその類似体は、血球細胞は接着しないが、血管内皮細胞は接着する現象が見出された^{14,15}。材料に吸着する蛋白質の量および細胞接着を誘起する構造変化の程度が、血球細胞が接着するためのフィブリノーゲンと血管内皮細胞が接着するためのフィブロネクチンでは異なることが機構の一つであることがわかった^{16~21}。さらに、蛋白質の吸着とそれに伴う構造変化が、中間水の量によって制御できることを見出している。

おわりに

本稿では、材料表面に吸着する蛋白質の状態に影響する水分子の役割に着目した。自由水と不凍水とは特性の異なる中間水の存在を定義した。また、生体適合性に優れた材料表面に共通して存在する中間水の構造・運動性および材料表面と水分子・蛋白質・細胞との相互作用を評価する手法について紹介した。

文献

- 1) Special Issue on the occasion of the 90th birthday of Prof Tsuruta T. The roles of water molecules in the interfaces between biological systems and polymers. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010; 21: 1827-970.
- 2) 岩田博夫. バイオマテリアル. 高分子学会 2005.
- 3) Tanaka M, Hayashi T, Morita S, Polym J. The roles of water molecule at the biointerface of medical polymers. *Polym J* 2013; 45: 701-10.
- 4) Tanaka M, Motomura T, Kawada M, et al. Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) - relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface -. *Biomateri-*

als 2000; 21: 1471-81.

- 5) Tanaka M, Mochizuki A, Ishii N, Motomura T, Hatakeyama T. Study on blood compatibility of poly(2-methoxyethylacrylate). Relationship between water structure and platelet compatibility in poly(2-methoxyethylacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate). *Biomacromolecules* 2002; 3: 36-41.
- 6) Tanaka M, Mochizuki A. Effect of water structure on blood compatibility - thermal analysis of water in poly(meth)acrylate. *J Biomed Mater Res A* 2004; 68: 684-95.
- 7) Hayashi T, Tanaka Y, Koide Y, Tanaka M, Hara M. Mechanism Underlying Bioinertness of Self-assembled Monolayers of Oligo(ethylene glycol)-terminated Alkanethiols on Gold: Protein Adsorption, Platelet Adhesion, and Surface Forces. *Phys Chem Chem Phys* 2012; 14: 10194-206.
- 8) Hatakeyama T, Tanaka M, Hatakeyama H. Studies on bound water restrained by poly(2-methoxyethyl phosphorylcholine): Comparison with polysaccharide-water systems. *Acta Biomater* 2010; 6: 2077-82.
- 9) Miwa Y, Ishida H, Saitô H, Tanaka M, Mochizuki A. Network structures and dynamics of dry and swollen poly(acrylate)s. Characterization of high- and low-frequency motions as revealed by suppressed or recovered intensities (SRI) analysis of ¹³C NMR. *Polymer* 2009; 50: 6091-9.
- 10) Morita S, Tanaka M, Ozaki Y. Time-resolved in situ ATR-IR observations of the process of sorption of water into a poly(2-methoxyethyl acrylate) film. *Langmuir* 2007; 23: 3750-61.
- 11) Morita S, Tanaka M. Effect of sodium chloride on hydration structures of PMEA and P(MPC-r-BMA). *Langmuir* 2014; 30: 10698-703.
- 12) Kobayashi S, Fukuda K, Kataoka M, Tanaka M. Regioselective Ring-Opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted Cyclooctenes with Ether Side-

- Chains. *Macromolecules* 2016; 49: 2493-501.
- 13) Osawa K, Kobayashi S, Tanaka M. Synthesis of Sequence-Specific Polymers with Amide Side-chains via Regio-/stereoselective Ring-opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted *cis*-Cycloocte. *Macromolecules* 2016; 49: 8154-61.
 - 14) 田中賢, 佐藤千香子, 小椋恵子, 他. 溶液から細胞を分離する細胞分離方法, および, 細胞分取用水和性組成物. 特開 2012-105579.
 - 15) Sato C, Aoki M, Tanaka M. Blood-compatible poly(2-methoxyethyl acrylate) for the adhesion and proliferation of endothelial and smooth muscle cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 145: 586-96.
 - 16) Hoshihara T, Nikaido M, Tanaka M. Characterization of the attachment mechanisms of tissue-derived cell lines to blood-compatible polymers. *Adv Healthc Mater* 2014; 3: 775-84.
 - 17) Tanaka M, Sato K, Kitakami E, Kobayashi S, Hoshihara T, Fukushima K. Design of biocompatible and biodegradable polymers based on the intermediate water concept. *Polym J* 2015; 47: 114-21.
 - 18) Hoshihara T, Nemoto E, Sato K, et al. Regulation of the contribution of integrin to cell attachment on poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogous polymers for attachment-based cell enrichment. *PLoS One* 2015; 10: e0136066.
 - 19) Hoshihara T, Otaki T, Nemoto E, Maruyama H, Tanaka M. Blood-Compatible Polymer for Hepatocyte Culture with High Hepatocyte-Specific Functions toward Bioartificial Liver Development. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7: 18096-103.
 - 20) Hoshihara T, Nemoto E, Sato K, Maruyama H, Endo C, Tanaka M. Promotion of adipogenesis of 3T3-L1 cells on protein adsorption-suppressing poly(2-methoxyethyl acrylate) analogous polymers. *Biomacromolecules* 2016; 17: 3808-15.
 - 21) Murakami D, Kobayashi S, Tanaka M. Interfacial Structures and Fibrinogen Adsorption at Blood-Compatible Polymer/Water Interfaces. *ACS Biomater Sci Eng* 2016; 2: 2122-6.

A3) 生体適合性：臨床評価マーカー

政 金 生 人

はじめに

2016年の診療報酬改定における、S型ダイアライザの新設は前述のごとく、生体適合性に優れる、抗酸化作用を有する、抗炎症作用を有するなど、従来のダイアライザの評価基準であった物質透過性とは別な機序により患者の病態を改善させる可能性があるという視点に基づいたものである。現時点ではEVAL[®]膜とPMMA膜が該当する¹⁾。ダイアライザの機能を考えるうえにおいて、物質除去特性と生体適合性は車の両輪であり、双方が複雑に交絡して透析治療の治療効果あるいは副反応が現れる。透析の治療効果（質的評価）を行う場合には、それぞれ因子を考えながら行う必要がある。物質除去特性については、小分子、低分子量蛋白に再現性のある除去物質の指標があるが、生体適合性を評価する臨床指標にはまだ定番がない。本項では透析膜の生体適合性がある程度関与したと推測される透析の質の評価に有用な臨床的指標について述べる。

I. 透析治療における生体適合性の解釈

医療工学における生体適合性とは1986のEuropean Society of Biomaterials Consensus Conferenceによれば、“The ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application.”とされ、「長期間にわたって生体に悪影響も強い刺激も与えず、本来の機能を果たしながら生体と平和共存ができる材料の性質」と訳されている²⁾。つまり生体適合性という概念は、生体材料と生体に引き起こされる反応に限定した用語であり、物質の化学的特性とそれにより引き起こされる現象の機序が明確に説明される必要がある。前項で述べられた、補体活性化、キニン・カリクレイン系の活性化、血小板活性化、炎症性サイトカインの誘導などは、この定義に合致している。しかしながら透析治療の臨床でしばしば用いられる「生体適合性」という言葉は、本来の意味するところよりかなり拡大解釈されてきている。一般的に、治療の質や効果を判定するための臨床指標は、生命予後

やQOLに好ましいあるいは好ましくない影響を与えるかどうかを予測する必要がある。ある生体材料が生体に引き起こす反応のメカニズムが明らかで、臨床的に悪影響が明らかな場合は理解しやすい。しかし、例えば透析膜の蛋白吸着特性により透析掻痒が改善するとしたらどのような理解になるだろう。生体内に病的レベルに蓄積した蛋白ではあるが、それらを吸着変性させるわけなので、用語的には生体適合性が悪いということになる。透析膜の生体適合性は悪いが、臨床的には好ましい結果を得るということになり、日常臨床でどちらが重要であるかは論を待たない。また前述のごとく、生体適合性と物質除去特性とくに低分子量蛋白の除去特性が相互に関連しているため、透析膜の生体適合性を治療モードが修飾し、総体として評価される透析膜の生体適合性が不明瞭になる可能性がある。例えば、PS膜による後希釈血液透析濾過（hemodiafiltration: HDF）では、ダイアライザ内のシェアストレスによって血小板が活性化されると報告されている³⁾。しかしながら、活性化した血小板から放出されるβトロンボグロブリンや血小板第4因子はHDFにより濾過されるため、治療総体としての生体適合性は改善されると報告されている³⁾。また前希釈オンラインHDFにおいては、ヘモダイアフィルタ内の血液希釈による線速度の上昇、膜表面へのコンタクトの減少からヘモダイアフィルタの生体適合性不良がマスクされる可能性も指摘されている^{4,5)}。

透析治療において日常的に「生体適合性」と称される場合は、厳密に透析膜と生体の反応ではなく、「臨床的にもたらされるよい結果が、透析量や尿毒症物質の除去効果では説明できない場合」に使用されていると理解しておく必要がある。これは用語的に混乱を生む可能性があり、例えばhuman compatibilityというような新たな表現が必要なかもしれない。

II. 生体適合性の臨床評価マーカー

日常臨床において、透析膜の生体適合性の関与がある程度予想される臨床評価マーカーの要件は、当該指標の良否が生命予後やQOLに影響を与える証拠や可

表 A3-1 臨床的生体適合性関連指標

1. 血液学的指標
—白血球数
—血小板数
2. 炎症・栄養指標
—CRP
—Interleukin-6
—総合栄養学的アセスメント (SGA, MIS, GNRI など)
—リンパ球数
3. 生理学的指標
—透析中血圧の変動
—末梢循環 (経皮的酸素分圧, 皮膚灌流圧)
4. その他
—アレルギー症状
—患者愁訴 (掻痒, 疲労感, 不眠など)

能性があるということ、当該指標の変動が透析処方を変えた際の効果判定に有効であるという2つが重要である。これまでに報告されている生体適合性の関与が推定される臨床評価指標を表 A3-1 にまとめ、以下のそれぞれについて簡単に解説する。

1. 血液学的指標

前項でも触れられているが、透析膜の生体適合性が注目された最初のエピソードは再生セルロース膜表面の遊離 OH 基による補体第二経路の活性化である。活性化補体は顆粒球を刺激し、接着分子を発言した顆粒球は肺毛細管血管床にトラップされて一過性の白血球減少がおこる⁶⁾。再生セルロース膜を用いた透析では、治療開始後に血液の酸素飽和度が低下することはよく知られていた。一方血小板は透析膜表面で活性化され、単独であるいは顆粒球や単球など他の血液成分と凝集塊を作る⁷⁾。この減少は一過性の血小板数の減少として捕らえられるとともに、顆粒球からの活性酸素の放出や透析中の末梢循環の低下として検知することが可能である⁸⁾。このように透析中の白血球数と血小板数の評価、末梢循環の持続的モニタリングは、透析治療の生体適合性を総合的に評価する指標として使用可能であり、透析条件を変更した場合でも比較が可能である。生体適合性を評価する古典的指標であるアナフィラトキシン (C3a, C5a) は残念ながら、コマーシャルベースで簡便に測定することは困難であり、日常の臨床評価指標としては用いられない。

2. 炎症・栄養指標

Monokine 仮説⁹⁾から MIA 症候群¹⁰⁾の概念に至るまで、微弱炎症が動脈硬化、栄養障害、アミロイド症など慢性透析患者にみられる多くの合併症の基礎になっていると理解されている。微弱炎症の原因として、尿毒症毒素や炎症性サイトカインの蓄積やラジカル消去能の低下など尿毒症病態に関連するもののほかに、透

析膜の生体適合性不良や透析液の細菌学的汚染なども非常に常用である。これらの炎症や栄養学的指標を定期的にモニタリングし、透析処方の適正化につなげることが可能である。

生体内における炎症の指標としては、C-反応性蛋白 (C-reactive protein: CRP), Interleukin-6 (IL-6), Fetuin A, 血清アルブミンなどが知られており、それぞれ透析患者において予後規定因子であると認識されている¹¹⁾。CRP は最も汎用される指標であり、また通常の CRP 測定キットの感度未満の高感度 CRP の測定は心筋梗塞の予測や透析患者において予後を占う意味でも重要な因子であると認識されている¹²⁾。IL-6 も透析患者の予後を規定する因子として報告されており、透析治療の生体適合性をモニタリングする指標として有効である¹³⁾。Fetuin A は肝臓で合成され異所性石灰化を抑制する因子であるが、炎症により抑制され MIA 症候群形成の重要な位置を占める。血清アルブミンは炎症のほか、肝機能や栄養状態、透析によるアルブミン損失などの影響を受けるため、単独で透析の生体適合性の指標としては使用しづらい。Honda によれば、IL-6 が心血管系合併症や死亡リスクの評価に最も有用であると報告している¹¹⁾。

栄養状態は透析患者の生命予後に最も強い影響を与える因子である。透析患者の栄養障害の原因は本稿で述べている炎症など生体適合性の因子だけでなく、食事摂取量と透析による栄養素の損失のバランスなどさまざまな因子の影響を受ける。またある透析患者の栄養障害の原因に占める生体適合性の割合は患者によって異なる。栄養状態の評価は subjective global assessment (SGA), malnutrition inflammation score (MIS), geriatric nutritional risk index (GNRI) などのスクリーニング指標を用いて体系的にかつ継続して行わなければならない。

ここで述べた炎症指標や栄養状態を臨床評価のマーカーとして使用する場合は、その数値と生体適合性不良を短絡的に結びつけて考えることはできない。明らかな炎症巣が特定できない炎症反応や明らかな原因が特定できない栄養障害に対して、透析処方を試行錯誤的に変更し、改善が得られるかどうかで生体適合性不良の関与を推察するのみである。例えば、明瞭な炎症巣を認めないが原因不明の CRP の軽度上昇があり、十分な栄養摂取が行われているにも拘わらず栄養障害が進行しているような場合には、PS 膜を PMMA 膜や EVAL 膜に変更することによって、状態の改善がえられるかどうかを判断する。

3. 生理学的指標

近年透析治療中に施行可能なさまざまな生理学的検査技術が登場し、その中には透析治療の生体適合性を推測することが可能な指標もある。前述のように、生体適合性不良により白血球が集簇して肺毛細血管床にトラップされれば、経皮的酸素分圧の低下として検知することができる。活性化した血小板が白血球と凝集塊を形成すると、これらは皮膚灌流圧の低下として関知することが可能である。近年最も用いられているPS膜では、血小板が活性化し末梢循環が障害されると報告されている^{2,8)}。それに比較してS型ダイアライザの一つであるEVAL膜では血小板刺激が少なく、血小板凝集塊がPS膜に比べて少なく、末梢循環が保たれると報告されている^{2,8)}。また膜表面に凝固系蛋白が吸着されやすいことが報告され、透析中の末梢循環に影響を与えていることが推測されている¹⁴⁾。近年、透析患者の高齢化や糖尿病性腎症の増加により、末梢動脈疾患(peripheral arterial disease: PAD)をもった患者が増加し、フットケアや救肢対策の重要性が認識されている。透析患者における大切断後の1年生存率は非常に低い。そのため日常の透析治療においては末梢循環を障害しないような透析処方求められる。PAD症例あるいはPADが疑われる症例において、末梢循環や皮膚の灌流圧が低下しているのであれば、ダイアライザをより生体適合性のよいものや血液透析濾過に変更し、これらの所見が改善するかどうかをみるべきである。

4. その他

現在汎用されているPS膜ではこれまでにアナフィラキシーショックの報告があり^{15,16)}、これらの中にはPS膜作成の必須成分であるPVP(ポビドン)が原因とされているものがある¹⁶⁾。PVPは疎水性材料の親水化や医薬品錠剤の賦形剤や結合剤として使用されており、ポビドンヨードは消毒薬として広く用いられている。2013年5月23日付けで内閣府からリリースされた「ポリビニルピロリドンに係る食品健康影響評価に関する審議結果(案)についての意見・情報の募集について」に添付されている添加物評価書には、PVPのアレルギーの可能性に言及しつつ、PVP内服による感作の成立よりも、ポビドンヨードなどの局所使用による感作成立の可能性に言及している¹⁷⁾。透析患者の皮膚の消毒にポビドンヨードが使用されることはよくあり、PS膜のアナフィラキシーの原因になっている可能性もある。ダイアライザの種類を変更する場合、特にPVP含有ダイアライザに変更する場合の初回透析時には、アナフィラキシーショックのリスクがあるこ

表 A3-2 臨床的評価指標のタイムスケール

- | | |
|----------------|---------------------|
| 1. 時間単位で判断可能 | —白血球数, 血小板数の変化 |
| | —末梢循環の指標 |
| | —透析中の血圧の変動 |
| 2. 週単位で判断が可能 | —透析掻痒症 |
| | —透析後の疲労感 |
| | —CRP, IL-6などの炎症マーカー |
| 3. 月・年単位で判断が必要 | —栄養状態 |

とを念頭において血圧や、浮腫、掻痒などのアレルギー反応の出現を見逃さないようにする必要がある。

慢性透析患者は尿毒素の蓄積と治療そのものの生体適合性不良から、微弱な炎症を背景として動脈硬化や栄養障害が進行するため、平均余命は健常者の約半分である¹⁸⁾。それだけでなく、透析患者は不眠、掻痒、レストレスレッグ症候群などの多くの不定愁訴を抱えており、これらは透析患者の生活の質を著しく低下させる。近年これらの愁訴のうち、透析低血圧¹⁹⁾や透析後の疲労感²⁰⁾、掻痒症²¹⁾、不眠²²⁾、うつ症状²³⁾などは生命予後を悪化させる因子であることが報告された。透析患者の不定愁訴は、透析の質の評価指標であり、透析患者の予後を改善させるための治療目標として捉えることができる。透析掻痒症は透析患者の46~53%に認められる比較的頻度の高い愁訴の一つであるが、S型ダイアライザの一つであるPMMAは掻痒に有効であると報告されている²⁴⁾。また日本透析医学会統計調査によると、PMMA膜は透析患者の死亡リスクを低下させる可能性が指摘されている²⁵⁾。

III. 臨床評価マーカーと透析処方変更のタイミング

本項では、透析膜の生体適合性の関与が想定され、透析の質を評価することが可能な指標にはさまざまなものがあることを述べた。それぞれの指標は透析膜の生体適合性だけでなく、物質除去特性や治療モードの影響を受け、生体側の反応と複雑に交絡している。これらの指標を臨床現場で有効に使うために、日本透析医学会維持血液透析ガイドライン²⁶⁾では、それぞれの指標を短期、中長期の二つのタイムスケールで評価するように提案している。これまで述べてきた指標をこの視点で分類したものが表 A3-2 である。短期的指標において生体適合性不良による不都合が疑われた場合には、ダイアライザの膜材質の変更を行い、その指標が改善するかどうかを検討する。例えば透析低血圧に

対する条件変更を行った場合には、長くても2週間ぐらいの評価期間で十分であろう。生体適合性不良による透析掻痒が疑われた場合には2週間から2か月ぐらいの比較的短時間で評価が可能であろう。逆に生体適合性不良による栄養障害を疑った場合には半年あるいは年単位の評価期間が必要である。このように、複数の透析の質を評価する指標をもち、治療目標を明確に定めて治療を行うことが大切である。透析掻痒症が強い場合などには、膜材質を変え、さらに透析量もあげ、内服薬も投与し、スキンケアも徹底するなど包括的なアプローチが必要になる場合もある。しかしながら、透析膜の生体適合性に起因する副反応であるのかどうかを明らかにするためには、可能であれば透析膜だけの変更で他の条件を変えないで2か月間は観察することが好ましい。そしてこの間に、掻痒の自覚的強度、好酸球数やIgE値の変化などを合わせて評価することが好ましい。

文献

- 川西秀樹, 峰島三千男, 友雅司, 水口潤. 血液浄化器(中空糸型)の機能分類2013. 透析会誌2013; 46: 501-6.
- 筏義人. バイオマテリアル—人工臓器へのアプローチ. 日刊工業新聞, 1988.
- Gritters-van den Oever M, Grooteman MP, Bartels PC, et al. Post-dilution haemodiafiltration and low-flux haemodialysis have dissimilar effects on platelets: a side study of CONTRAST. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3461-8.
- Masakane I, Esashi S, Igarashi H. Biocompatibility of predilution on-line hemodiafiltration. *Blood Purif* 2013; 35(Suppl): 34-8.
- Sakurai K, Saito T, Yamauchi F, Asahi D, Hosoya H. Comparison of the effects of predilution and postdilution hemodiafiltration on neutrophils, lymphocytes and platelets. *J Artif Organs* 2013; 16: 316-21.
- Ing TS, Daugirdas JT, Popli S, Gandhi VC. First-use syndrome with cuprammonium cellulose dialyzers. *Int J Artif Organs* 1983; 6: 235-9.
- Bonomini M, Stuard S, Carreno MP, et al. Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron* 1997; 75: 402-11.
- Sato M, Morita H, Ema H, Yamaguchi S, Amano I. Effect of different dialyzer membranes on cutaneous microcirculation during hemodialysis. *Clin Nephrol* 2006; 66: 426-32.
- Henerson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldon S. Hemodialysis hypotension: the interleukin-1 hypothesis. *Blood Purif* 1983; 1: 3-8.
- Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55: 1899-911.
- Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 139-48.
- Menon V, Wang X, Greene T, et al. Relationship between C-reactive protein, albumin, and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 44-52.
- Rao M, Guo D, Perianayagam MC, et al. Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 324-33.
- Urbani A, Lupisella S, Siroli V, et al. Proteomic analysis of protein adsorption capacity of different haemodialysis membranes. *Mol Biosyst* 2012; 8: 1029-39.
- Daugirdas JT, Bernardo AA. Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia. *Kidney Int* 2012; 82: 147-57.
- Bacelar Marques ID, Pinheiro KF, de Freitas do Carmo LP, Costa MC, Abensur H. Anaphylactic reaction induced by a polysulfone/polyvinylpyrrolidone membrane in the 10th session of hemodialysis with the same dialyzer. *Hemodial Int* 2011; 15: 399-403.
- http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000034tf3-att/2r98520000034tlk_1.pdf
- 中井滋, 政金生人, 秋葉隆, 他. わが国の慢性透析療法の実況(2005年12月31日現在). 透析会誌2007; 40: 1-30.
- Shoji T, Tsubakihara Y, Fujii M, Imai E. Hemodialysis-associated hypotension as an independent risk factor for two-year mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; 66: 1212-20.
- Rayner HC, Zepel L, Fuller DS, et al. Recovery time, quality of life, and mortality in hemodialysis patients: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* 2014; 64: 86-94.
- Narita I, Alchi B, Omori K, et al. Etiology and prognostic significance of severe uremic pruritus in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006; 69: 1626-32.
- Elder SJ, Pisoni RL, Akizawa T, et al. Sleep quality predicts quality of life and mortality risk in hemodialysis patients: results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 998-1004.
- Lopes AA, Albert JM, Young EW, et al. Screening for depression in hemodialysis patients: associations with diagnosis, treatment, and outcomes in the

- DOPPS. *Kidney Int* 2004; 66: 2047-53.
- 24) Lin HH, Liu YL, Liu JH, et al. Uremic pruritus, cytokines, and polymethylmethacrylate artificial kidney. *Artif Organs* 2008; 32: 468-72.
- 25) 日本透析医学会統計調査委員会. (1) 透析処方関連指標と生命予後. 椿原美治編. 図説わが国の慢性透析療法
の現況 (2009年12月31日現在). 東京: 日本透析医学会, 2010; 66-89.
- 26) 日本透析医学会. 維持血液透析ガイドライン: 血液透析処方. 第4章 適切な透析量・治療効果を得るための評価. *透析会誌* 2013; 46: 610-3.

A4) 生体適合性：透析膜からの溶出物

土田 健司

I. エチレンオキサイドガス

ダイアライザからの溶出物は患者との異物反応に関わる重要な要素となることは古くから知られている。そのなかの一つに滅菌残留物であるエチレンオキサイドガスがあり、患者によって過敏反応が現れることがある。本邦におけるダイアライザの旧承認基準である透析型人工腎臓装置承認基準では透析膜自体を含めダイアライザの各部品からの溶出量の上限が設定されていた¹⁾。しかし、この溶出物試験は基本的にセルロース系透析膜を対象として非臨床的に実施する方法として制定されたものである。透析膜（あえてダイアライザではなく、膜そのものを指す）の場合の具体的な溶出物試験の方法は、1.5 g の透析膜を準備し、事前に煮沸冷却した 150 mL の水を 70 L、60 分間加温する。こうして得られた試験液は、透析膜を用いないで抽出操作を行った空試験液と比較し、外観、あわだち、pH、亜鉛濃度、銅濃度、および紫外可視吸光スペクトル进行分析することとなっていた。

II. 生体反応と PVP

溶出物が問題視されるのは、それが患者との相互作用の原因となるためである。溶出する物質の種類や量を分析するには、ダイアライザの原材料に用いられている物質から考えて溶出する可能性があるものの候補をあげ、それぞれに適した抽出方法、分析方法を選択する必要がある。近年、継続的に患者反応があると認識されている溶出物の代表が、ポリスルホン系透析膜に添加されているポリビニルピロリドン (PVP) である²⁾。

櫻井らは、特定のダイアライザでアレルギー反応を呈した患者の、補体活性および治療開始直後の白血球数の急激な減少は、各ダイアライザの PVP 含有量が多いほど大きな反応が観察された症例があることを報告した³⁾。PVP は現在、ほとんどすべてのポリスルホン系透析膜に添加されている。その一方で、PVP は過去に輸血が不足した時の代用血漿として増粘剤として

用いられていた時期があるが、現在では同じ用途では使われなくなっている。

しかし、疎水性の強い合成高分子であるポリスルホンには、この PVP を添加することによって血液と接触する膜表面が親水化され、血液蛋白の付着量やそれによる血球類への異物反応が小さくなるという効果があり、現在は広くダイアライザの親水化剤として用いられている。PVP の種類や膜からの溶出しやすさは製造方法等の影響を受け、各メーカーが独自の技術で開発および製造している。このうち、放射線滅菌によって PVP を架橋させて溶出量を減らす工夫や、PVP が酸化劣化しにくくなるような充填液を用いている製品もあるが、一方で PVP の溶出や過敏症も報告されている^{4,5)}。現時点では、高圧蒸気滅菌の製品でも同様に報告例があり、PVP を用いていること自体がリスクになると考えざるを得ない場合も出てきている。

III. PVP の挙動

PVP の溶出量は製品や溶出する条件によってさまざまに変化する。神野らはダイアライザごとの充填液とプライミング初流液中の PVP 量を UV 吸光度の測定から検討したところ、2つのウェットタイプのダイアライザで吸光度のピークを認めた⁶⁾。このように、一部のウェットタイプポリスルホン系ダイアライザの場合には、充填液中にある程度 PVP が溶出していることが確認されている⁶⁾。ドライタイプの場合には、プライミング後に製品を長時間放置することによって溶出し、さらに血液側にプライミング液を循環させると溶出量が増えていく報告がある⁷⁾。

一方、プライミングによってある程度付着している PVP は洗い流されることが知られている^{6,7)}。この特性に関しては、PVP は分子量に分布があり、比較的大きな分子量から比較的小さな分子量まで存在し、小さな分子量の PVP はプライミング時に膜から溶出しやすいと考えられている。ポリスルホン系透析膜は外側の透析液側のポアサイズが大きな構造をしていることから、透析液側のほうが血液側よりも PVP が出てきやすい傾向がある。また、大きな分子量の PVP はプライ

ミング後、血液回路内へ徐々に溶出してくる特性があると考えられている。プライミング後も透析膜内やその表面に止まるPVPは、体外循環中にも徐々に血液側流路へ溶出していることが考えられる。

IV. PVPの定量法

PVPの定量分析方法としてはヨウ素と反応させて定量するMuller法が古くから知られている。村上らはPVPが放射線で滅菌されると構造変化を起こし、Muller法で検出されなくなる特性があることを報告した⁸⁾。さらにガンマ線照射によってPVPはMuller法で定量できなくなる例がある。この原因の一つとして、PVPはガンマ線照射を受けるとhigh performance liquid chromatography (HPLC) チャートの保持時間が短い時間が少なくなっており、低分子量化していることが考えられる。また、旧製造承認基準のすべての残留・溶出物を把握する方法としてCOD-Mnがあった。村上らはCOD-MnとCOD-Cr、TOCを比較分析して報告している。そして溶出物の全量を測定するにはCOD-Crが最も高い数値を示し、COD-MnやTOCよりも適していると考えられると報告している。またこれを簡易的に分析するには紫外可視吸光分析を波長223 nmがCOD-Crと高い相関があるのでこれを推奨すると報告している⁸⁾。これらの分析するサンプルの作成方法としては、充填液、プライミング液、循環抽出液、製品を分解して抽出した液が考えられる。またそのサンプルを得るダイアライザの前処理として、滅菌前、滅菌後、滅菌後の保管時間によってその抽出量は変化することも知られている^{6,7)}。

V. ビスフェノールA

このほかの膜からの溶出物として近年着目されているものとして、ビスフェノールA (bisphenol A: BPA)がある。BPAはポリスルホンとポリカーボネート、ポリアリレート、エポキシ樹脂などに用いられている化学物質で、内分泌攪乱作用があるといわれている。

近年、透析膜の過敏症報告例として、BPAも疑われる事例が報告されている。小西ら⁵⁾はポリスルホン系ダイアライザで過敏症を認めた7症例にダイアライザ抽出液、BPA水溶液を用いて皮膚プリックテストを実施した。小西らはこの結果について、ポリスルホン膜の過敏症を呈した症例はPVPを含む抽出液では説明しづらく、むしろBPAやその他の物質のほうが皮膚

プリックテストの結果を説明しやすいと考察している。

VI. BPAの生体反応

BPAの生体への影響は主に動物を対象としたものが多かった。BPAは体内では肝臓で親水化された後、腎臓から尿へ排泄される代謝経路をとる。これに関連して、ヒトでもCKDの進行とともに体内に蓄積し、血清濃度が上昇することが報告された⁹⁾。またBPA溶出ダイアライザと非溶出ダイアライザの比較研究の論文によると、BPA溶出リスクのあるダイアライザを用いると、炎症マーカーや酸化ストレス刺激がより強いことが確認された¹⁰⁾。

VII. BPAの検出方法

BPAの濃度測定には液体クロマトグラフィーもしくは市販のELISA試薬が用いられているが、PVPと比較すると濃度測定は容易ではない。村上らは複数の市販製品の充填液やプライミング液を紫外可視吸光で分析している。日本透析医学会によって特別な機能を有すると定義された2種類の透析膜のうち、PMMA膜ダイアライザからの溶出とその特有な臭いがこの分析方法で高く検出されることも報告している¹¹⁾。このことから、紫外可視吸収による溶出量の分析は溶出物としてPVPを対象とした場合に限定して適用しないと矛盾が生じてしまう。特別な機能を有する透析膜の定義にPVP溶出がないということを定義した場合にはその溶出物測定方法でなく、むしろ原材料にPVPを用いていないことが必要十分条件になると考えられる。

文献

- 1) 透析型人工腎臓装置承認基準。昭和58年6月20日、薬発第494号。
- 2) 中曾洙、西岡正登、新光聡子、他。cPS膜透析器との関連が危惧される病態について。腎と透析63別冊ハイパフォーマンスメンブレン'07, 2007; 275-9。
- 3) 櫻井健治、高畑美美、土谷知子、他。HP膜の生体適合性についての検討—親水化剤PVPは悪影響を与える?—。腎と透析別冊60ハイパフォーマンスメンブレン'04, 2004; 137-42。
- 4) 堀裕貴、堀内勇人、田中かおり、他。PS膜透析器FXにおける溶出物の検討。腎と透析別冊67ハイパフォーマンスメンブレン'11, 2011; 159-62。
- 5) 小西修二、福永淳、山下勇人、他。皮膚プリックテストによる透析膜溶出物の生体に与える影響。腎と透析別冊71ハイパフォーマンスメンブレン'15, 2015; 154-8。

- 6) 神野卓也, 西川繁, 牧尾健司, 他. 洗浄方法の違いによるポリスルホン膜の残留物と溶出物の特性. 腎と透析別冊 70 ハイパフォーマンスメンブレン '14, 2014; 37-43.
- 7) 金子亜美, 滑川巨希, 松田雅人, 他. 保管期間が異なる合成高分子透析膜からのPVP溶出特性. 腎と透析別冊 66 ハイパフォーマンスメンブレン '10, 2010; 190-3.
- 8) 村上淳, 金子岩和, 木全直樹, 他. ダイアライザの溶出物に関する適正評価法の検討. 腎と透析別冊 69 ハイパフォーマンスメンブレン '13, 2013; 124-7.
- 9) Krieter DH, Canaud B, Lemke HD, et al. Bisphenol A in chronic kidney disease. *Artif Organs* 2013; 37: 283-90.
- 10) Bosch-Panadero E, Mas S, Sanchez-Ospina D, et al. The Choice of Hemodialysis Membrane Affects Bisphenol A Levels in Blood. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 1566-74.
- 11) 村上淳, 金子岩和, 木全直樹, 他. 各種ダイアライザにおける充填液, 洗浄液中の溶出物の基礎検討. 腎と透析別冊 68 ハイパフォーマンスメンブレン '12, 2012; 153-6.

A5) 透析膜の吸着特性

山下 明 泰

はじめに

固体と流体（気体または液体）が接している場合、流体中に存在する溶質分子が固体との接触により、何らかのエネルギーによって固体に結合する現象を吸着（adsorption）と称する。吸着を生じる固体を吸着材または吸着体（adsorbent）という。吸着現象は、吸着材の外部から目視により確認できるいわゆる固体表面のみならず、固体に存在する細孔内部の空隙の表面でも生じる。したがって、細孔を多数有する複雑な物理構造の材料の場合、吸着に供する材料表面は莫大となる。ここでは、一般的な吸着現象の理解から始め、吸着材と類似の物理構造を有する血液浄化膜によって生じる吸着現象の特殊性を捉え、その評価方法についても言及する。

I. 一般的な吸着のメカニズム

吸着のメカニズムは、化学反応による化学吸着（chemisorption）と物理的エネルギーによる物理吸着（physisorption）とに大別できる。一般に前者は不可逆であるのに対し、後者は可逆である。血液浄化治療

に用いられているのは主に物理吸着である。物理吸着のメカニズムとしては、(1) ファンデルワールス力、(2) 静電的効果、(3) 疎水性相互作用の3種類が知られている。

実際には吸着は、多段に生じる複雑な現象である。被吸着分子（着目溶質）が流体中にある場合を考える（図A5-1）。まず第1段階で、被吸着分子は沖合における分子拡散により流体中を移動する。次に、固体近傍で親和性の高い部位に移動する表面拡散（surface migration）の第2段階を経て、細孔内へと移動する。細孔内では分子自身のサイズと細孔のサイズとが拮抗するため、分子同士の衝突よりも分子と細孔壁との衝突で移動現象が決まる Knudsen 拡散が生じる（第3段階）。やがて最終段階として、細孔壁が被吸着分子を吸着する。このように吸着は、その前段階として3段の拡散現象を伴うため、吸着全体の速度もこれらの拡散過程が律速段階となることが多い。

また、吸着と同時に脱着も生じているため、正味の吸着速度は吸着速度 r_a と脱着速度 r_d との差となる。液相中の A 成分が吸着される場合を考える。吸着による材料表面の被覆率を θ とすると、

$$\frac{d\theta}{dt} = r_a - r_d \dots\dots\dots (1)$$

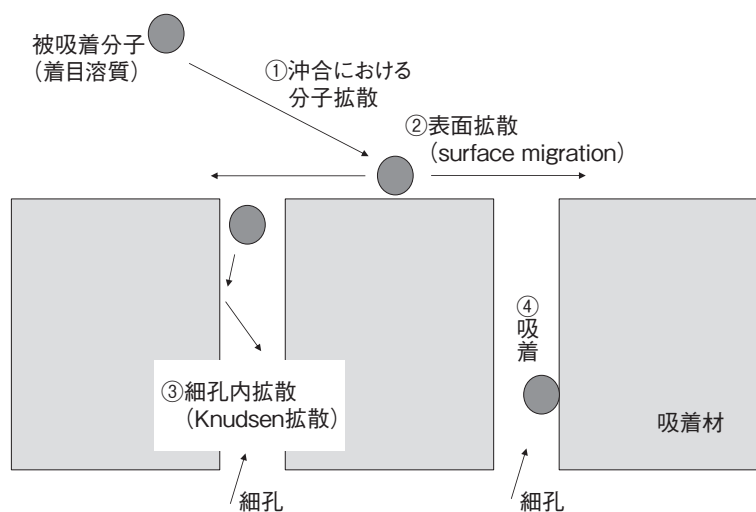


図 A5-1 一般的な多段の吸着機構
吸着は ①→②→③→④ の順に進行する。

となる。Langmuir は単層吸着を仮定して、

$$r_a = k_a(1 - \theta) C_A \dots\dots\dots (2)$$

$$r_d = k_d \theta \dots\dots\dots (3)$$

とした。ここに k_a および k_d は吸着および脱着速度定数、 C_A は成分 A の濃度である。このとき被吸着分子が単層に隙間なく吸着した場合の吸着量を最大吸着量 M_∞ 、および速度定数の比として定義される吸着平衡定数 $K (= k_a/k_d)$ を介して、定常状態における吸着量 M は次式で表すことができる。

$$M = (M_\infty \theta) = \frac{M_\infty K C_A}{1 + K C_A} \dots\dots\dots (4)$$

これを Langmuir の吸着等温式という。このほかにも、吸着機構が不明の場合には Freundlich の式、多層吸着を説明する場合には BET の式などがある¹⁾。

II. 血液浄化法に用いられる吸着

1. 吸着材による吸着

固体材料の吸着能は、通常、吸着材単位質量あたりの吸着面積で定義される比表面積で比較する。代表的な吸着材である活性炭は、ヤシガラ、石炭、木炭を原料として、800~1,000 °C で水蒸気と反応させて活性炭化することで、比表面積が原料で 50~200 m²/g だったものが 800~2,500 m²/g へと莫大な数値を獲得するようになる。この細孔に有機物などが吸着されるため、長期間の脱臭などに利用することができる。ただし活性炭は、水のような極性分子は殆ど吸着しない。

血液浄化の分野でも吸着材は、血液吸着法 (hemo-adsorption: HA) または血液直接灌流法 (direct hemo-perfusion: DHP) として古くから利用されているが、活性炭は尿素に対する吸着能をほとんどもたないことから、血液透析 (hemodialysis: HD) と併用するか、解毒の効果を期待して補助人工肝臓としての用途に限られてきた。ただし、活性炭外表面の構造が血球成分 (特に血小板) に損傷をもたらすため、材料をマイクロカプセル化する技術が不可欠である。これにより血液および生体への適合性は改善されるが、吸着能の低下は否めない²⁾。

操作条件にもよるが、被吸着分子の濃度に比べ、吸着材の量が圧倒的である場合、被吸着分子は吸着筒の入口近傍ですべて吸着される。時間の経過とともに、入口近傍の吸着材は吸着飽和に達するが、これに続く部分でやはりすべての被吸着分子が吸着される。この間、吸着筒出口では被吸着分子の濃度は常にゼロとなる。やがて出口で濃度が観測されるようになるが、この点を破過点 (breakthrough point)、それまでに要し

た時間を破過時間 (breakthrough time) という¹⁾。これ以降は装置全体の吸着能は急激に低下し、装置全体が吸着飽和に達して、正味の吸着が終了した時点で、被吸着分子は装置を素通りする。しかし、血液浄化治療の場合には、このような状態になるまで吸着材を使用することはなく、溶質の除去は治療開始から終了時まで非定常・非平衡で進行する。このため前項で述べたような、平衡時の吸着量に各種の吸着等温式を当てはめて、 K や M_∞ を求めることで吸着のメカニズムを説明することはできない。

2. 血液浄化膜による吸着

先に物理吸着について3つの機構をあげたが、血液浄化膜で溶質除去に直接的に影響するのは、強い陰性荷電膜による静電的効果による吸着 (AN69[®] など)、および疎水性相互作用による吸着である。石油由来の合成高分子膜の場合、材料そのものはいずれも疎水性であるが、多くの場合、材料を親水化すること、および膜に細孔を生じさせることの2つを目的として親水化剤 (多くの場合、PVP) が添加されている。したがって疎水的な吸着はあまり生じないが、親水化剤を使用していない PEPA 膜においては、強力な吸着能が報告されている³⁾。

上記に加えて、分離膜は複雑な物理構造を有しているため、その細孔内に被吸着分子がはまり込むようにして生じる吸着があるといわれている⁴⁾。PMMA には親水化剤が使用されていないため、材料自体が疎水性であるが、これに加えて 25~35 μm の厚み全体が密に詰まった均質膜であるため、溶質が膜を透過する途中の段階で細孔内に留まる可能性が他の分離膜よりも高い。このようにして生じる現象は、物理化学的なメカニズムによる吸着とは異なるが、血液浄化の分野ではこれも含めて「膜による吸着」と呼ばれている。

III. 現象の評価と臨床での評価

維持血液透析 (HD) 治療の治療条件は、血流量 $Q_B = 200$ mL/min、透析液流量 $Q_D = 500$ mL/min が標準的であり、これに若干の限外濾過による除水を伴う。また、わが国では現在、前希釈方式のオンライン血液透析濾過 (HDF) が盛んに行われるようになった。いずれの治療においても、溶質除去は小分子溶質では分子拡散、中・大分子溶質では限外濾過が支配的であり、吸着が問題になることはあまりない。しかし、急性血液浄化領域で行われている連続血液透析濾過 (CHDF) の標準的な治療条件は、 $Q_B \leq 100$ mL/min、 $Q_D + Q_S \leq 1,000$ mL/hr = 16.7 mL/min (Q_S は補充液流量) である

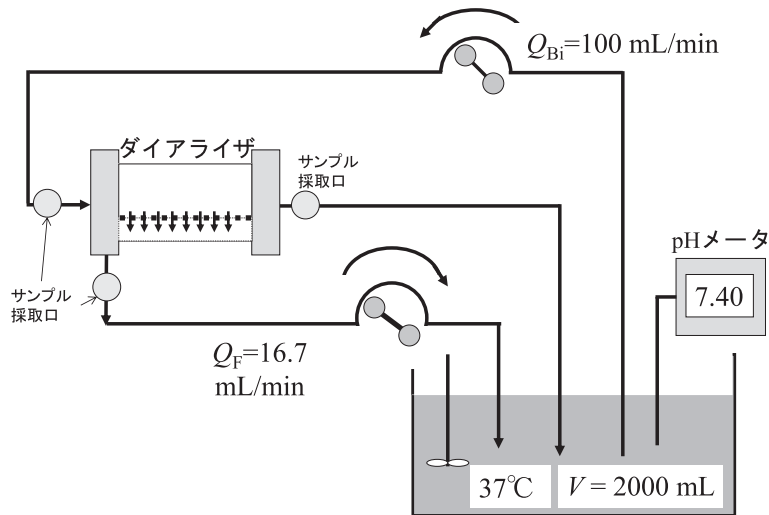


図 A5-2 吸着能評価のための限外濾過実験回路
試験溶質（ α キモトリプシノーゲン）の初期濃度 0.45 mg/mL

ため、拡散も限外濾過も十分には生じない⁵⁾。そこで、分離膜の有する吸着能が大きな役割を果たす可能性が指摘されている^{6,7)}。急性血液浄化領域で対象となる疾患は多岐にわたるが、敗血症を含め炎症性のサイトカインの除去が重要になることが多い⁸⁾。これらのサイトカインの存在量は微量 (pg/mL のオーダー) であっても生理活性 (毒性) は高い。しかし微量であるがゆえに、分離膜の有する吸着能は長時間持続するといわれている。

分離膜で透過と同時に吸着が生じている場合、これを評価するには、次に定義する吸着クリアランス C_{Lads} を用いるとよい。すなわち、HD または HDF の場合には、

$$C_{Lads} = C_{LB} - C_{LD} \dots\dots\dots (5)$$

また血液濾過 (HF) の場合には、

$$C_{Lads} = C_{LB} - C_{LF} \dots\dots\dots (6)$$

である。ただし、

$$C_{LB} = \frac{\dot{m}_B}{C_{Bi}} \dots\dots\dots (7)$$

$$C_{LD} = \frac{\dot{m}_D}{C_{Bi}} \dots\dots\dots (8)$$

$$C_{LF} = \frac{\dot{m}_F}{C_{Bi}} \dots\dots\dots (9)$$

$$\dot{m}_B = Q_{Bi}C_{Bi} - Q_{Bo}C_{Bo} \dots\dots\dots (10)$$

$$\dot{m}_D = Q_{Do}C_{Do} \dots\dots\dots (11)$$

$$\dot{m}_F = Q_F C_F \dots\dots\dots (12)$$

C_{LB} は血液側で定義される溶質の消失クリアランス、 C_{LD} または C_{LF} はそれぞれ透析液側または濾液側で定義される溶質の出現クリアランスである。

図 A5-2 には (PVP を含まない) PEPA 膜 (FLX-

10GW, 以下 FLX, 日機装(株)), (PVP を含む) 親水化 PEPA 膜 (FDX-100GW, 以下 FDX, 日機装(株)), および PMMA 膜 (CH-1.0 N, 東レ・メディカル(株)) の 3 種類の透析膜について、その吸着能を調べることを目的に行った限外濾過実験の回路を示した。試験液 (疑似血液) として使用したのは、分子量 25,400 の α キモトリプシノーゲン (蛋白質) を含むリン酸緩衝水溶液 (pH=7.40) である。試験液槽からポンプでダイアライザに送液された試験液は、そのままダイアライザを素通りするか、中空糸膜の外側へ濾過されてタンクへ還流するため、膜での吸着がない場合には、 $C_{LB} = C_{LF}$ であり、槽内の溶質濃度は初期濃度のまま不変となる。この濃度が低下する場合には、 $C_{LB} > C_{LF}$ であり、すなわち $C_{Lads} > 0$ となるはずである。図 A5-3 にはこの実験で得られた C_{LB} および C_{LF} を示した ($Q_B = 100$ mL/min, $Q_F = 16.7$ mL/min)。親水化 PEPA 膜を用いた FDX では、実験開始直後から $C_{LB} = C_{LF} = Q_F = 16.7$ mL/min となり、吸着はみられなかった。しかし同じ PEPA 膜でも、親水化されていない FLX では、実験初期において C_{LB} は高値を示すのに対し、 C_{LF} はゼロから増加し、やがて $Q_F (= 16.7$ mL/min) に収束した。同様な傾向は PMMA 膜でも観測されている。同じデータを C_{LB} と C_{LF} の差で定義した C_{Lads} で表記したのが図 A5-4 である。

吸着能を次式で定義するマスバランスエラー (mass balance error, %MBE)

$$\%MBE = \frac{\dot{m}_B - \dot{m}_F}{\dot{m}_B} \times 100 \dots\dots\dots (13)$$

で評価することもできる (図 A5-5) が、これを図 A5-4 と比較するとその挙動は必ずしも C_{Lads} とパラレルで

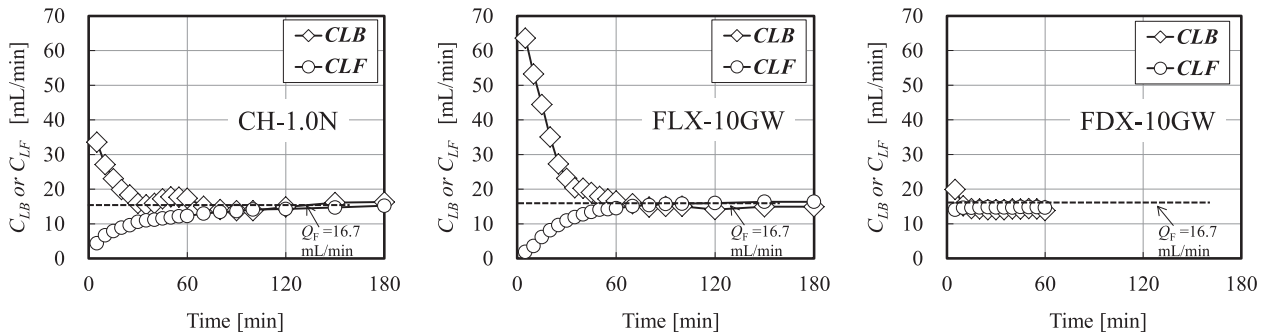


図 A5-3 C_{LB} および C_{LF} の経時変化
 $Q_{Bi} = 100 \text{ mL/min}$
 $Q_F = 1,000 \text{ mL/hr} = 16.7 \text{ mL/min}$

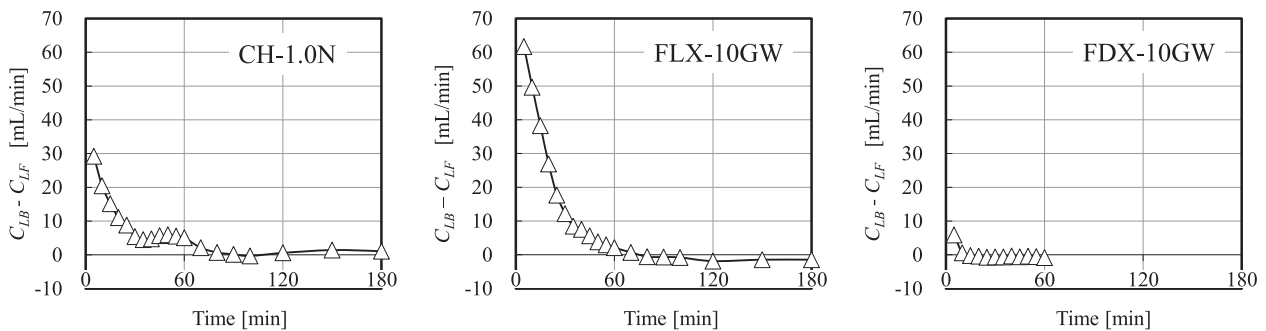


図 A5-4 吸着クリアランス $C_{Lads} = C_{LB} - C_{LF}$ の経時変化

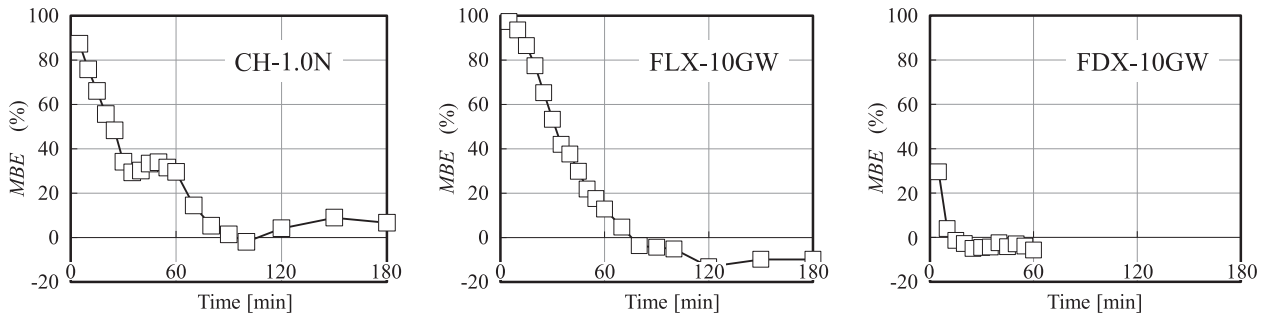


図 A5-5 %MBEの経時変化

はない。これは%MBEが比で定義されているため、絶対値の変動を反映しないためである。また、%MBEからは吸着量の絶対値 M_{ads} を知ることができないが、 C_{Lads} を使用すれば、その定義から

$$M_{ads} = \int_0^t C_{Lads} C_{Bi} dt \dots\dots\dots (14)$$

と推定できる。In vitroの実験系では M_{ads} を試験液槽内の濃度変化から、

$$M_{ads} = V \times \{C_{Bi}(0) - C_{Bi}\} \dots\dots\dots (15)$$

とするのが、簡便で確実にされている。そこで図A5-6には(15)式から算出した吸着量(横軸)と、(14)式から求めた吸着量(縦軸)との関係を示した。試験液槽内の濃度は、回路およびダイアライザのプライミ

ング液により、実験開始直後に急激に低下する。この現象は避けがたく、吸着量を過大に評価する。しかし、その1点(初期の100 mg前後)を除けば、両者はよく一致し、FLXおよびCH-1.0Nでは勾配がほぼ1の直線が得られた。(15)式のように槽内の濃度変化から吸着量を算出することは、臨床的にはできないので、膜に吸着した溶質を実測する方法を除けば、(14)式は実用性のある唯一の吸着量推算法といえる。

おわりに

物理化学の教科書に説明されている物理吸着のメカニズムは、ファンデルワールス力、静電的効果、およ

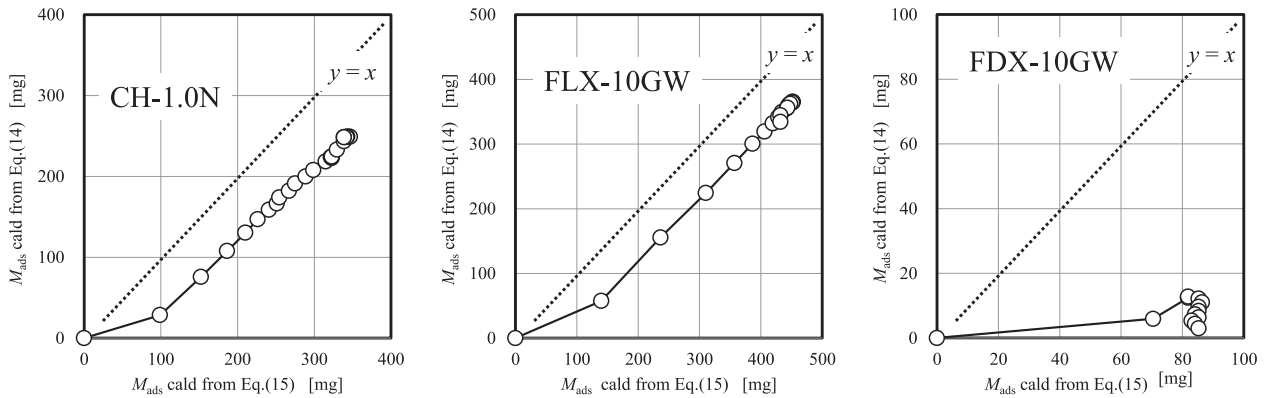


図 A5-6 2つの吸着量算出式による吸着量の比較

吸着膜 (CH-1.0N, FLX-10GW) では, 初期の希釈効果を除いて, ほぼ勾配1の直線が得られた。

び疎水性相互作用の3つであるが, 血液浄化膜による吸着の場合には, これらに加えて, 細孔内へのはまり込みを吸着としてとらえることが多い。膜による吸着の絶対量や吸着のメカニズムを臨床的に評価することは難しく, 現在までに確立された方法はない。われわれは血液側からの消失クリアランスと透析液 (濾液) 側への出現クリアランスの差を吸着クリアランスと定義することで, 簡便かつ合理的に吸着量を推定できることを示した。

文献

- 1) Hines AL, Maddox RN. Mass Transfer-Fundamentals and Applications, 14 Adsorption, New Jersey: Prentice-Hall, 1985: 456-500.
- 2) Chang TM. Semipermeable microcapsules. Science 1964; 146: 524-5.
- 3) Yamashita AC, Tomisawa N, Takezawa A, Sakurai K, Sakai T. Blood compatibility and filtration character-

istics of a newly developed polyester polymer alloy membrane. Hemodial Int 2004; 8: 368-71.

- 4) Yamashita AC, Tomisawa N. Importance of membrane materials for blood purification devices in critical care. Transfus Apher Sci 2009; 40: 23-31.
- 5) 山下明泰, 富沢成美. 血液浄化法に使用する血液浄化器の種類と特徴. 救急医学 2008; 32: 1647-51.
- 6) Tateishi Y, Oda S, Sadahiro T, et al. Continuous hemodiafiltration in the treatment of reactive hemophagocytic syndrome refractory to medical therapy. Transfus Apher Sci 2009; 40: 33-40.
- 7) Nakamura M, Oda S, Sadahiro T, et al. The role of hypercytokinemia in the pathophysiology of tumor lysis syndrome (TLS) and the treatment with continuous hemodiafiltration using a polymethylmethacrylate membrane hemofilter (PMMA-CHDF). Transfus Apher Sci 2009; 40: 41-7.
- 8) 日本急性血液浄化学会. 日本急性血液浄化学会標準マニュアル: 2 敗血症性ショック. 東京: 医学図書出版, 2013: 183-7.

A6) 膜吸着性：in vitro 評価法

久保田 昌裕

はじめに

「血液浄化器（中空糸型）の機能分類 2013」¹⁾および厚生労働省より平成 28 年 3 月 4 日に通知された保医発 0304 第 10 号「特定保険医療材料の定義について」において、ポリメチルメタクリレート（PMMA）膜は S 型として設定されている。

PMMA 膜はほぼ均一な対称構造を有することから膜抵抗は大きいものの比較的大きな細孔をもち、アルブミンに近い中大分子量物質の除去に優れたブロードタイプの分画特性をもつ。さらに、蛋白質吸着特性をもち、特に膜透過が困難な高分子物質の吸着除去を可能としている。具体的な報告例として、酒井はポアサイズや膜荷電が異なるさまざまな PMMA 膜で、特有の臨床症状改善の効果が得られていることを示しており²⁾、その一因として、血中に蓄積した小分子量から中大分子量領域までのさまざまな物質が蛋白吸着特性を有する PMMA 膜で除去されることが考えられる。実際、in vitro 評価にて、PMMA 膜の蛋白吸着量がポリスルホン膜より多いことが検証されており、アルブミン近傍、あるいは、それよりも大きな物質も吸着除去しうることも報告されている³⁾。また、近年開発された、フィルトライザー NF シリーズでも同等の蛋白吸着特性が認められており⁴⁾、従来 PMMA 膜と同様の臨床症状改善効果を有していることが検証されつつある。PMMA 膜の代表的な臨床症状改善例としては、貧血改善効果が論述されており、その一因として、分子量 100 万前後の造血阻害因子の除去があると述べられている⁵⁾。また、他膜と PMMA 膜をクロスオーバーにて使用した際、PMMA 膜変更数か月後に透析搔痒感が有意に軽減されることが論述されている⁶⁾。同様の効果として、海外からも透析搔痒感の軽減に関する報告があがっており⁷⁾、これらの作用機序として、分子量 16 万近傍の物質の除去が関与しているとの報告もある²⁾。その他、FLCs 低減効果⁸⁾、免疫能改善効果などの臨床報告⁹⁾も示されており、いずれも透析膜の拡散・濾過のみでは除去しきれない中大分子量物質が PMMA 膜によって吸着除去されることが作用してい

ると考察されている。

本報告では、透析膜への蛋白吸着評価法の例として吸着型ダイアライザである PMMA 膜を用いた測定方法を紹介する。

I. マスバランスエラーからの吸着現象の推定

β_2 -ミクログロブリン (β_2 -MG) のクリアランス測定時のマスバランスエラーを計算することにより、吸着が起こる膜であるか否かの指針が得られる。以下に測定方法と結果を示す。

1. 測定溶液

血液側溶液には、原則として抗凝固化牛全血液を血漿分離した牛血漿を使用する。牛血漿の場合は、総蛋白濃度 (TP) = 6.5 ± 0.5 g/dL とする (牛血液の場合は、ヘマトクリット (Hct) = $30 \pm 3\%$ 、総蛋白濃度 (TP) = 6.5 ± 0.5 g/dL とする)。抗凝固薬にはクエン酸系、ヘパリンなどを使用する。採取血液量に応じて採血タンクにあらかじめ所定量の抗凝固薬を入れておき、採血後は十分に攪拌する。また、溶血した血液やフィブリンが過剰に析出した血漿は使用しない。透析液としては、pH が 7.4 近辺となる市販透析液、緩衝液などを使用する。

2. 測定回路・測定条件

図 A6-1 に示す川西らの委員会報告¹⁰⁾の「基本回路」に準ずるものを使用する。測定時の流量は $Q_B = 200 \pm 4$ mL/min, $Q_D = 500 \pm 15$ mL/min, $Q_F = 10.0 \pm 1$ mL/min/m²、貯槽内の血液側ならびに透析液側に使用する溶液の温度は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ とする。溶質濃度は、 β_2 -MG は 0.01~0.5 mg/dL、尿素は 100~150 mg/dL とする。試薬以外に CAPD などから調製したものを用品もよい。測定時間は開始後 60 min および 240 min とする。

3. クリアランスの測定

次式に従い算出する。

$$CL = \frac{Q_{Bi} \times C_{Bi} - Q_{Bo} \times C_{Bo}}{C_{Bi}}$$

CL：クリアランス (mL/min) (小数点以下第 2 位を四

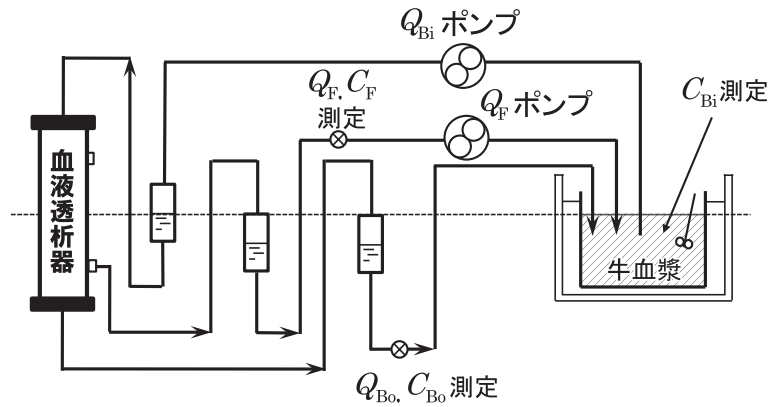


図 A6-1 測定回路
(文献 10 の図を元に改変)

表 A6-1 各種 PMMA ダイアライザの β_2 -MG クリアランス (mL/min) とダイアライザ入出口濃度 (mg/dL)

	B3-1.3A	B1-1.6H	BK-1.6U	BK-1.6P	BK-1.6F	BG-1.6U	BG-1.6PQ	NF-1.6U	NF-1.6H
クリアランス	4.9	42.5	51.9	50.3	53.2	52.7	63.0	39.6	56.1
C_{Bi}	0.107	0.097	0.099	0.098	0.101	0.091	0.097	0.096	0.091
C_{Bo}	0.114	0.083	0.079	0.080	0.081	0.073	0.072	0.084	0.071
C_{Do}	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001

捨五入)

- Q_{Bi} : 血液側入口流量 (mL/min) (あらかじめ検量)
- Q_{Bo} : 血液側出口流量 (mL/min) (メスシリンダー等で実測)
- C_{Bi} : 血液側入口溶質濃度
- C_{Bo} : 血液側出口溶質濃度
- マスバランスエラー(%MBE)は次式より算出する。

$$\%MBE = -\frac{M_B - M_D}{M_B} \times 100$$

(小数点以下第 1 位を四捨五入)

- $M_B = Q_{Bi} \times C_{Bi} - Q_{Bo} \times C_{Bo}$
- $M_D = Q_{Do} \times C_{Do}$
- Q_{Do} : 透析液出口流量 (mL/min) (メスシリンダー等で実測)
- C_{Do} : 透析液出口溶質濃度

4. 測定結果

表 A6-1 に、各 PMMA ダイアライザを評価した際の 1 時間循環後の β_2 -MG クリアランスとそのときの血液側入出口濃度および透析液側出口濃度を示すが、全銘柄とも β_2 -MG クリアランスを有しているにも拘わらず、すべて透析液側出口濃度は検出下限以下 (≤ 0.001 mg/dL) となっている。また、図 A6-2 には、マスバランスエラーをポリスルホン系の膜と比較して示した。PMMA ダイアライザの種類を問わず、 β_2 -MG において、マスバランスエラーが大きいことから、蛋白質が吸着されていることが、推定される。

II. 透析膜へ吸着した蛋白質の測定

吸着した蛋白質は、透析膜から抽出して測定することもできる。ここでは、ミニモジュールを用いて測定する方法を紹介する。

1. ミニモジュール作製

各ダイアライザ製品のハウジングの両端を切断し、中空糸束を取り出す。取り出した糸束は RO 水中で保管する。中空糸束から、糸の折れや曲がりのない中空糸を 48 本抜き出し、図 A6-3 に示すような円筒状のポリカーボネート製のハウジング (内径 5 mm, 長さ 120 mm) に通す。ハウジングの両端には、後の端部カット工程で切断し易いように塩ビ製チューブを取り付ける。ハウジングの端部は、エポキシ樹脂 (コニシ社製クイックメンダー) で封止する。このとき、糸の有効長 (糸の外表面がポッティング剤に触れていない部分の長さ) が 110 mm となるよう、エポキシ樹脂を適量とする。その後、中空糸を 1 本ずつに分けエポキシ樹脂を中空糸に馴染ませる。これを両端部について行い、エポキシ樹脂が固まった後、チューブカッターで両端部を切断し、中空糸内側を開口させる。切断面はルーペなどで確認し、潰れた糸や気泡による凹みなどないことを確認し、血清循環用のミニモジュールとする。

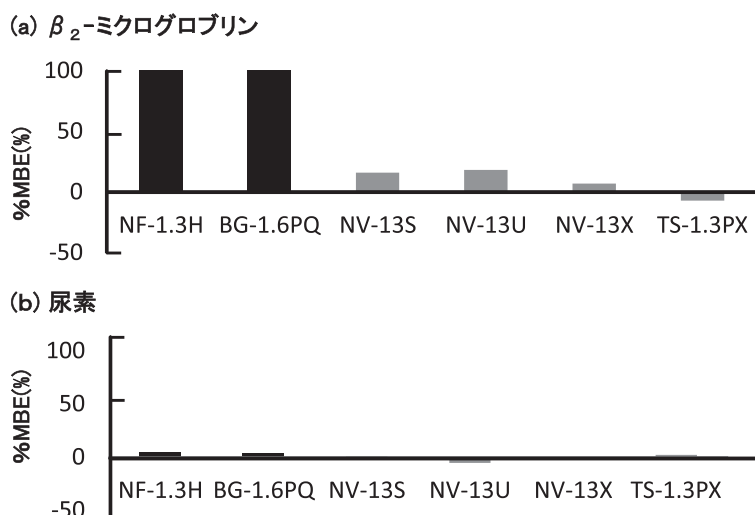


図 A6-2 各種透析膜のマスバランスエラー

PMMA 膜：NF-1.3H, BG-1.6PQ

ポリスルホン膜：NV-13S, NV-13U, NV-13X, TS-1.3PX



図 A6-3 ミニモジュールハウジング

2. 血清循環

図 A6-4 に示すペリスタポンプ（アトー社製）に回路となる内径 2 mm のシリコンチューブをセットしたミニモジュールでの循環回路を準備する。PBS(-)を用いて、0.8 mL/min の流量で 10 分間流し、中空糸内側（図 A6-4 ①）、中空糸外側（図 A6-4 ②）の順でプライミングを行う。

血清を循環するため、ビーカーにヒト血清（ACCESS BIOLOGIES 社製 HUMNA SERUM）を 5.7 mL 計り取り、37 °C の温浴で保温する。中空糸内側を血清で置換するため、流量 0.8 mL/min で流し、最初の 2 分間を廃棄する（図 A6-4 ③）。その後、中空糸外側にも

チューブを接続し、流量 0.1 mL/min で濾過をかける。この濾液も回収し、循環状態とする（図 A6-4 ④）。循環は 4 時間行う。循環終了後、余分な血清を洗浄するため、プライミング時と同様の手順で中空糸内側・外側を PBS(-) で洗浄する。

3. 膜吸着蛋白質の調製

ミニモジュールから糸束を取り出し、1 mm 片に細断し、エッペンドルフチューブに入れる。RO 水を 1 mL 入れ、3 回洗浄する。蛋白質抽出液として、40% 酢酸水溶液 5 mL を加えて一晩振盪する。その後、抽出液を真空乾燥し蛋白質のみを回収する。回収した蛋白質試料を 1 mL の PBS(-) に溶解し、蛋白質量を BCA プロテインアッセイキット（Thermo SCIENTIFIC 社製）で定量する。定量結果を元に、蛋白質量が 1 μ g/10 μ L となるよう蛋白質溶液とサンプルバッファー（テフコ社製、Aspartic Acid Sample Buffer (2 \times)) を 10 μ L ずつ混合し、電気泳動用サンプルとする。電気泳動用サンプルは 5 分間沸騰水中で加熱処理した後、放冷する。

4. 電気泳動

電気泳動装置は、テフコ社製セイフティーセルミニ STC-808 を用い、電源装置はアトー社製 my Power500 AE-8150 を用いる。電気泳動用ゲルにはテフコ社製 4~12% LS-PAGE ミニゲル（1.0 mm, 12 well）、分子量マーカーは Amersham Biosciences 社製 Protein Molecular weight Standards broad range MW 6500-205000 を用いる。泳動バッファーとしてはテフコ社製 Aspartic Acid Running Buffer を使用する。電圧条件は 100 V 定電圧で行い、泳動時間は 70 分間とする。泳動終了後、クマシーブリリアントブルー

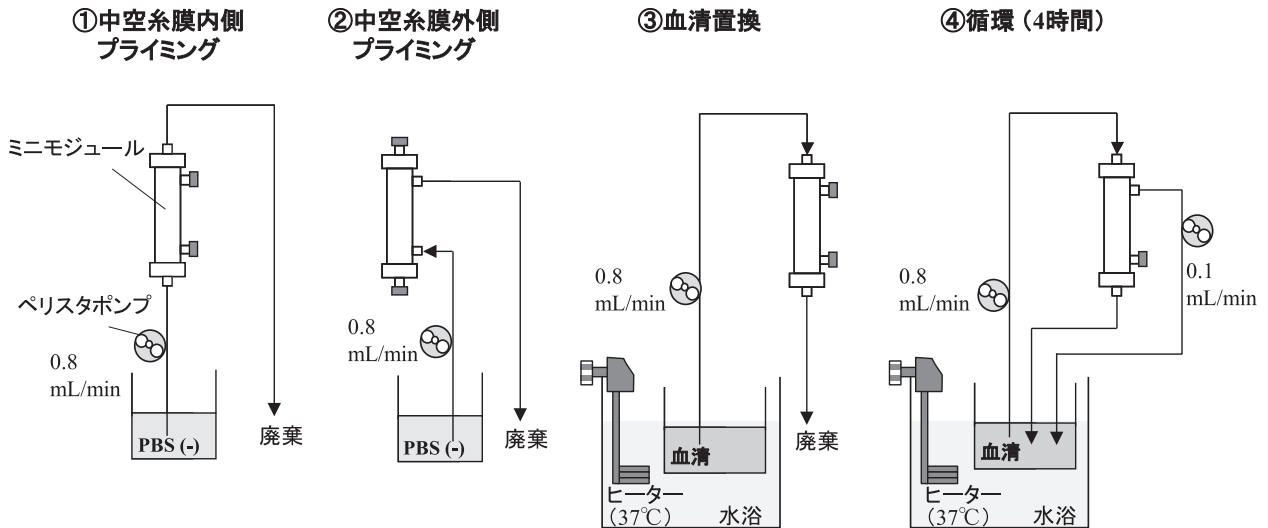


図 A6-4 ミニモジュール血清循環時の回路

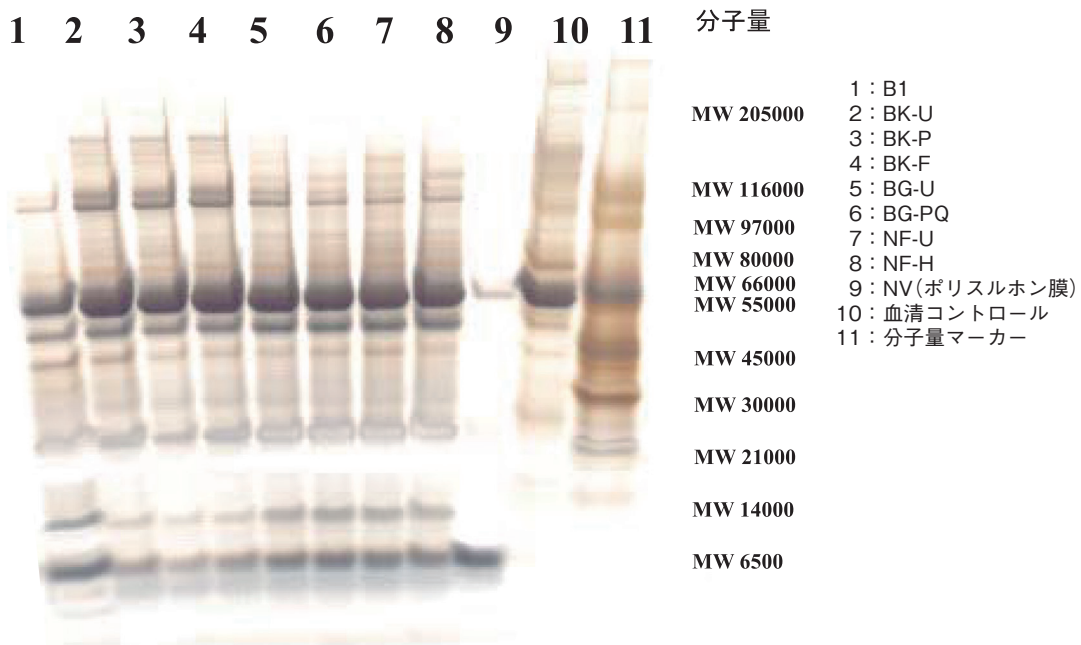


図 A6-5 各種 PMMA 膜に吸着した蛋白質の電気泳動像

染色を行った後、銀染色を行う。ここで、クマシーブリリアントブルー染色試薬としては、Pharmacia Biotech 社製、PhastGel[®] Blue R 40Tablets を用い、銀染色試薬としては、和光純薬株式会社製、電気泳動用銀染色 II キットワコーを用いる。

5. 測定結果

透過型スキャナを用いてゲルを撮影し、図 A6-5 に示す電気泳動像を得た。評価したすべての PMMA 膜において、比較として測定した NV (ポリスルホン膜) に比べて、多くの蛋白質の吸着が認められ、拡散あるいは濾過では除去できないような中大分子量領域の蛋

白質吸着も認められた。

まとめ

ダイアライザの吸着特性を測定する方法はいくつか報告されているが、ここでは、S 型のうち吸着型ダイアライザである PMMA 膜を用いたクリアランス測定から吸着が起こっていることを推定する方法と、透析膜に吸着した蛋白質を抽出して測定する方法を紹介した。クリアランスの測定においては定量的評価が可能であり、マスバランスエラーの計算によってどの程度

の吸着が起こっているかも推定することができる。また、透析膜から抽出して測定する方法においては、定量性は劣るものの、吸着した蛋白質の分子量パターンの解析が可能である。

文献

- 1) 川西秀樹, 峰島三千男, 友雅司, 水口潤. 血液浄化器(中空糸型)の機能分類2013. 透析会誌2013; 46: 501-6.
- 2) Sakai Y. Polymethylmethacrylate membrane with a series of serendipity. *Contrib Nephrol* 2011; 173: 137-47.
- 3) 板垣一郎. PMMA (polymethylmethacrylate) 膜. 酒井清孝, 峰島三千男編. わかりやすい透析工学—血液浄化療法の科学的基礎—. 東京: 南江堂, 2012; 42-6.
- 4) 高橋博, 上野良之, 藤枝洋暁, 他. 血小板付着を抑制した新規 PMMA 膜人工腎臓“フィルトライザー”NF の創出. 腎と透析75別冊ハイパフォーマンスメンブレン'13 2013; 22-5.
- 5) 栗山哲, 友成治夫, 宇都宮保典, 他. 短時間透析に関する研究(第4報) —大孔径透析膜(BK-F)の腎性貧血改善効果—. 透析会誌 1994; 27: 1483-7.
- 6) Kato A, Takita T, Furuhashi M, et al. Polymethylmethacrylate efficacy in reduction of renal itching in hemodialysis patients: crossover study and role of tumor necrosis factor- α . *Artif Organs* 2001; 25: 441-7.
- 7) Lin HH, Liu YL, Liu JH, et al. Uremic pruritus, cytokines, and polymethylmethacrylate artificial kidney. *Artif Organs* 2008; 32: 468-72.
- 8) Cohen G, Rudnicki M, Schmaldienst S, Hörl WH. Effect of dialysis on serum/plasma levels of free immunoglobulin light chains in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 879-83.
- 9) Duranti E, Duranti D. Polymethylmethacrylate strengthens antibody response in hemodialysis patients not responding to hepatitis B vaccine: preliminary data. *Minerva Med* 2011; 102: 469-74.
- 10) 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2012. 透析会誌2012; 45: 435-45.

A7) 抗炎症能・抗酸化能

友 雅 司

はじめに

血液透析器の性能向上には著しいものがあるが、生体にとっては異物であることより、血液透析膜と血球との接触でおこる生体反応の完全な制御には至っていない。

血液透析器の膜表面との接触刺激により、好中球よりはフリーラジカル、単球よりは炎症性サイトカインが産生され、微細炎症へと続く(図 A7-1)。

そのため、透析膜の生体適合性を向上させることはきわめて重要であり、透析膜表面の化学的および物理的生体適合性を高めること(血球等の刺激を低減させること)に重きがおかれていた。

一方、この生体適合性向上を図るとともに、膜との接触により刺激された血球より産生されたフリーラジカルの消去または反応を軽減させることについても実用化がなされている¹⁾。

透析膜の抗炎症作用、抗酸化作用とその評価法について概説する。

I. 透析膜の抗炎症作用、抗酸化能

透析患者における微細炎症と生命予後の関係については、多くで論じられており、微細炎症を改善するこ

との重要性は既知のものとなっている。透析患者における微細炎症の原因としては、透析液の組成・清浄度とともに透析膜の生体適合性も大きく影響すると考えられる。

この透析膜の生体適合性については従来の再生セルロース膜より合成高分子膜への転換において、大きく進歩・向上したと考えられる。合成高分子膜等においては従来の再生セルロース膜(特に、キュプロアンモニウムレーヨン膜)と比較して、生体適合性の向上が報告されている²⁾。

膜の化学的、物理的特性の変化により血液・血球の刺激を低減化により、これらの変化が得られたと考えられる。

一方、抗酸化能膜、抗炎症能膜とは透析膜自体に「血液・血球の刺激により産生されたフリーラジカル等」を捕捉したり、「炎症性サイトカイン」を吸着することにより微細炎症反応を停止・中断する機能・特性を有するものである。

II. 抗炎症能、抗酸化ストレスを有する膜

抗炎症能・抗酸化ストレス機能をもつ透析膜として、現在本邦で流通しているものとしてはPMMA膜、poly acryl nitrile (PAN)膜、Vitamin-EコーティングPS膜があげられる。

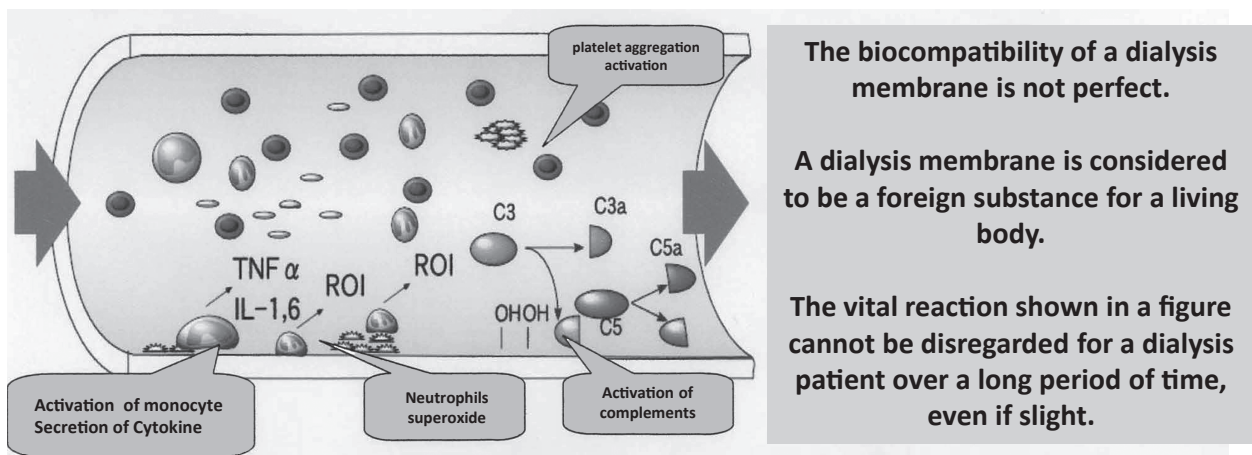


図 A7-1 透析膜と血球との反応

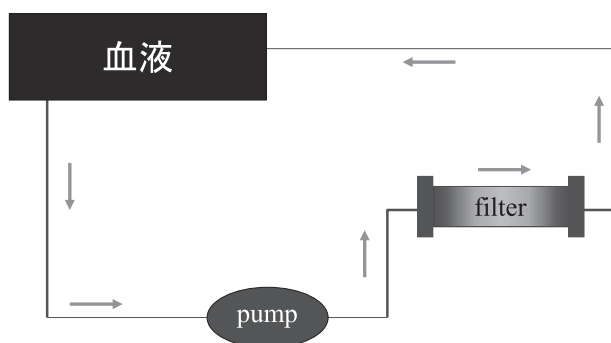


図 A7-2 Scheme of the priming cycle for experiment

PMMA 膜, PAN 膜はサイトカインを吸着することが報告されており, サイトカインの吸着により, サイトカインネットワークによる炎症活性化を中断・軽減する可能性が推測される。PMMA 膜, PAN 膜にてのサイトカイン吸着のデータに関しては急性血液浄化療法のものが多く, 慢性維持血液透析患者のデータはきわめて少ない。また, これらの膜の抗炎症能という特徴はサイトカイン吸着・捕捉によることより, 抗炎症能の多くはサイトカインなどの物質の吸着・捕捉によると推測される。

一方, Vitamin-E コーティング PS 膜は, 血液透析過程において産生された酸化ストレス (ラジカルストレス) をスカベンジ (毒消し) することも目的として抗酸化剤である Vitamin-E をコーティングしており, 膜素材の生体適合性の向上のみならず, 産生されたフリーラジカルなどの捕捉も目的としている。

Ⅲ. 抗炎症能, 抗酸化能をもつダイアライザの評価法

抗酸化能をもつダイアライザの評価法であるが, いくつかの試みがなされているが, 一般的かつ標準的な評価法は確立されていない。

抗酸化能をもつダイアライザである Vitamin-E コーティング膜に関しての評価の一例として, フリーラジカル (ヒドロペルオキシドラジカル) の産生を測定することで, 抗酸化能の評価を行うことも検討されている。

われわれの健常者ボランティア血液 (著者の自己血液) を用いての *ex vivo* の実験結果を示す。

1. 実験方法

健常者血液 (100 cc+ヘパリンナトリウム 5,000 単位) をローラーポンプにて, Vitamin-E コーティングセルロース膜, と Non Vitamin-E コーティングセルロース膜にそれぞれ充填し (図 A7-2), 4 時間室温下

(20℃) に置いたのち, それぞれの膜より血液を回収し, 血漿を分離したのち, 血漿 200 μ mL に Luminol 10 μ L, t-buOOH 100 μ L を添加したのち, Berthold 社 LB953 を用いて, それぞれの血漿ラジカル活性を測定した。

2. 結果

Vitamin-E コーティング膜に充填した血液からの血漿ラジカルが Non Vitamin-E コーティング膜に充填した血液からの血漿ラジカルと比較して有意に低く, Vitamin-E の抗酸化能は有効に作用する可能性を示唆している (図 A7-3)。

また, そのほかにも鉄還元/抗酸化力測定試験を用いて Vitamin-E コーティング膜の効果を臨床的に評価することも試みられている³⁾。

また, Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) 産生抑制において Vitamin-E コーティング膜の使用は, Vitamin-E の内服 (600 mg/day) と同等の効果を示したとの報告もある⁴⁾。実臨床においてこれらの SOD を測定することも有用かも知れない。

酸化ストレスの指標として酸化 LDL を測定し, この酸化 LDL の変化により Vitamin-E コーティング膜の抗酸化効果を評価している報告もみられる⁵⁾。

しかし, 維持透析症例の酸化ストレスの指標としてコンセンサスが得られたマーカーはないのが実状である。

In vitro

抗酸化膜素材ミニモジュール等を用いての血液 (ヒト血液および牛血液) 循環試験

抗酸化膜素材と分離血球 (好中球または単球) との接触試験

In vivo

維持透析患者に抗酸化膜素材ダイアライザを用いての酸化ストレスマーカーの検討

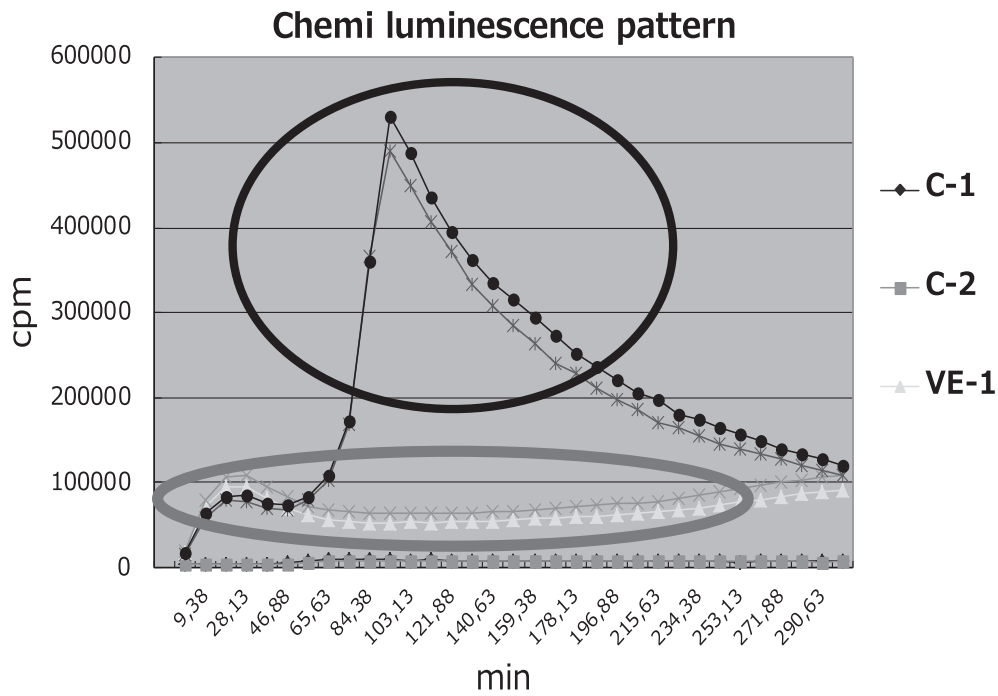
治療前後での酸化ストレスマーカーの検討

フィルター前後での酸化ストレスマーカーの検討

まとめ

抗酸化能, 抗炎症能透析膜とは透析膜自体に「血液・血球の刺激により産生されたフリーラジカル等」を捕捉したり, 「炎症性サイトカイン」を吸着することにより微細炎症反応を停止・中断する機能・特性を有するものである。

これらの抗酸化能, 抗炎症能について, フリーラジカル測定, サイトカインの測定が試みられているが, 現状において, 抗酸化能の評価法においては標準的な



	control	Vitamin E	Non Vitamin E coating	
CPM	2889666	38683333	96190000 *	* P < 0.01

図 A7-3 Vitamin-E コーティング膜と Non Vitamin-E コーティング膜充填血液血漿のラジカル活性

ものではなく, *in vitro*, *in vivo* の評価により総合的に評価すべきと考えられる.

文献

- 1) Clermont G, Lecour S, Cabanne JF, et al. Vitamin E-coated dialyzer reduces oxidative stress in hemodialysis patients. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 233-41.
- 2) Zhang DL, Liu J, Cui WY, Ji DY, Zhang Y, Liu WH. Differences in bio-incompatibility among four bio-compatible dialyzer membranes using in maintenance hemodialysis patients. *Ren Fail* 2011; 33: 682-91.
- 3) Floridi A1, Piroddi M, Pilolli F, Matsumoto Y, Aritomi M, Galli F. Analysis method and characterization of the antioxidant capacity of vitamin E-interactive polysulfone hemodialyzers. *Acta Biomater* 2009; 5: 2974-82.
- 4) Akiyama S, Inagaki M, Tsuji M, et al. Comparison of effect of vitamin E-coated dialyzer and oral vitamin E on hemodialysis-induced Cu/Zn-superoxide dismutase. *Am J Nephrol* 2005; 25: 500-6.
- 5) Yang SK, Xiao L, Xu B, Xu XX, Liu FY, Sun L. Effects of vitamin E-coated dialyzer on oxidative stress and inflammation status in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *Ren Fail* 2014; 36: 722-31.