

## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 642 号	氏名	道越 淳一
審査委員会委員	主査氏名	穴井博文 (印)	
	副査氏名	重光 修 (印)	
	副査氏名	秦 聡孝 (印)	
論文題目 Evaluation of Proteins and Cells that Absorb to Dialysis Membranes Used in Continuous Hemodiafiltration : Comparison of AN69ST, Polymethylmethacrylate, and Polysulfone Membranes (持続的血液ろ過透析で使用される透析膜へ吸着されるタンパクおよび細胞の評価 : AN69ST 膜, ポリメチルメタクリレート膜, ポリスルホン膜の比較)			
論文掲載雑誌名 Blood Purification			
論文要旨 【目的】本研究は、持続的血液濾過透析 (CHDF) に使用される 3 種の膜, AN69ST 膜, PMMA 膜, および PS 膜に関して、膜表面の吸着血球およびタンパクを解析し、膜素材における吸着性能の差異について検討したものである。 【対象と方法】CHDF を施行した血行動態不安定な 80 例。CHDF に使用したカラムから中空糸を取り出し、走査型電子顕微鏡を用いて中空糸膜表面に吸着した血球成分の評価を行った。さらに中空糸に吸着したタンパクを抽出し、タンパク量の測定と、二次元電気泳動および TOF/MS 解析によるタンパク同定ならびにケミカルメディエータ 27 項目の解析を行った。 【結果】AN69ST 膜は PS, PMMA 膜に比し活性型白血球の吸着を多く認め、PMMA 膜では血小板の吸着を多く認めた。タンパク量解析では、AN69ST 膜 1222mg/m <sup>2</sup> , PMMA 膜 493mg/m <sup>2</sup> , PS 膜 433mg/m <sup>2</sup> の吸着を認めた。二次元電気泳動および TOF/MS 解析では、各膜に特徴的なタンパクの吸着を認めた。ケミカルメディエータの解析では、AN69ST 膜では IL-17, Eotaxin, IP-10, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, PMMA 膜では IP-10, MIP-1 $\beta$ , PS 膜では IL-17, IP-10 が多く吸着していた。特に AN69ST 膜ではケモカインの吸着を多く認めた。 【考察】AN69ST 膜で活性型白血球の吸着を多く認めた。重症敗血症では活性化好中球からのエラスターゼや活性酸素種の放出を抑制することで、CHDF における有効性が示唆された。膜に吸着したタンパク量および特徴は、膜表面の陰性荷電の違いやイオン結合、疎水結合の違いにより大きく異なると考えられた。ケミカルメディエータの解析では、どの膜もサイトカイン以上にケモカインの吸着を多く認めた。敗血症症例で高サイトカイン血症に対して、IL-6, IL-8, TNF $\cdot$ a などのほか様々なメディエータを吸着除去することで生命予後の改善につながる可能性示唆された一方、膜への吸着除去は、有益な物質まで除去する可能性も示唆された。 (結語) AN69ST 膜は他 2 種に比し、吸着タンパク量が多く、活性化好中球の除去能が高い事が示唆された。また、各膜種において付着するタンパクに差異が認められ、治療効果への関与が示唆された。 本論文は CHDF に用いられる 3 種の膜の特性を評価したものであり、血液浄化療法を用いた重症患者の治療効果の向上に貢献できる研究であると考えられ、審査員の合議により、学位論文に値すると判定した。			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第642号	氏名	道越 淳一
審査委員会委員	主査氏名	穴井博文 (印)	
	副査氏名	重光 修 (印)	
	副査氏名	秦 聡孝 (印)	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査員から、研究の目的、方法、結果、考案のついて次の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 本来CHDFでは小分子量のサイトカイン等ほろ過されて除去されているのか、分子量の大きなものはろ過されないものもあるのか、ろ過されて排出されている量と比し吸着されているのはどの程度の量に相当するのか。</li> <li>2. CRRTの適応は、各透析膜の振り分けに偏りはなかったのか。特に敗血症および敗血症性ショック症例数はそれぞれの透析膜群でどうであったのか。</li> <li>3. 血球成分の吸着ポイントの決め方に関して、血栓に関してはどのようにポイントを決めたのか。</li> <li>4. AN69ST膜では、プライミング時にヘパリンコーティングを行ったのか。他の透析膜ではどうであったのか。</li> <li>5. 臨床検体を用いた研究であるため、その処理方法・過程は重要である。具体的にどのようなタイムスケジュールで研究を遂行したのか。</li> <li>6. 電子顕微鏡での観察には各症例の使用済み中空糸から3箇所画像を選定しているが、全体のばらつきを考慮して、評価に十分といえるのか。</li> <li>7. 各種ケミカルメディエーターの定量的な測定に用いたアッセイ系について説明せよ。</li> <li>8. 血球成分の吸着に関して、PMMAとPS（特にPMMA）は血栓形成、血小板や赤血球の付着が起りやすく、抗血栓性が低く、AN69STは白血球の付着、つまりは異物反応というか免疫学的な反応が強く起こっているとは言えないのか。</li> <li>9. 走査電顕像に示されている白血球および活性化白血球に関して、付着が均一な部と全く付いていない部があるが、白血球等の付着の機序についてはどのように考えるのか。敗血症および敗血症性ショック例で多く付着するよう傾向はあったのか。</li> <li>10. IL-17、IP-10、MIP-1bの吸着量が違うのは、膜の物理的性状、親水性かどうかですべて説明がつくと考えてよいか。実際の膜性状と吸着の実証はvitroでないと証明できないと思われるが、文献的には証明されているのか。</li> <li>11. Ionic bonding, hydrophobic bondingという言葉が出てくるが、本来の膜の分子構造を意味するのか。また陰性荷電との関係があるのか。</li> <li>12. 二次元電気泳動において、AN69ST膜で同じ番号を振られている円の中にpHの違う複数点があるが、これらは同一の物質と考えてよいのか。</li> <li>13. 走査電顕像では他の膜と比較してPS膜で顕著にBlood clotが観察されるが、スコア化した後の棒グラフでは有意ではない。この結果の乖離に関する合理的説明をせよ。</li> <li>14. 吸着されたサイトカイン分析で炎症性サイトカインとして重要なIL-6の検出はいずれの膜においても低値であったが、一部の膜ではその除去効果自体は期待できると報告されている。IL-6の除去メカニズムに関する考察と本研究結果の解釈につき、説明せよ。</li> <li>15. 本研究は膜に注目したものであるが、serumや透析液中の成分分析を行うことで、さらに発展する可能性があるか否かなど今後の本研究の方向性・将来性について説明せよ。</li> <li>16. CHDFに用いる膜の選択について研究内容を鑑み、意見を述べよ。</li> </ol> <p>これらの質問に対し、学位申請者から概ね明解な解答、解説が行われ、審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 道越淳一

## 論 文 題 目

Evaluation of Proteins and Cells that Absorb to Dialysis Membranes Used in Continuous Hemodiafiltration : Comparison of AN69ST, Polymethylmethacrylate, and Polysulfone Membranes

.....  
(持続的血液ろ過透析で使用される透析膜へ吸着されるタンパクおよび細胞の評価 : AN69ST 膜, ポリメチルメタクリレート膜, ポリスルホン膜の比較)

## 要 旨

.....(目的) 集中治療領域では循環動態の不安定な腎不全患者に対しての持続的血液濾過透析 (CHDF) は必要不可欠な治療法となっている。使用される膜は PS 膜, PMMA 膜, AN69ST 膜など特徴的な構造を持った膜が使用されている。今回, われわれは, 膜表面の吸着血球およびタンパクに着目し, 膜素材における吸着性能の差異について検討した。.....

.....(研究対象および方法) 対象は, 血行状態不安定な急性腎不全患者 31 例, 慢性腎不全患者 20 例, 重症敗血症患者 15 例, 敗血症性ショック患者 14 例にて CHDF を施行した患者である。.....

治療終了後に膜本体を解体し, 洗浄した中空糸を取り出し走査型電子顕微鏡を用いて中空糸内表面を観察, 膜表面に吸着した血球成分を評価した。次に, 中空糸に吸着したタンパクを抽出し, タンパク量を測定し, 二次元電気泳動および TOF/MS 解析を行いタンパク同定ならびにケミカルメディエータ 27 項目の解析を行った。.....

(結果) AN69ST 膜は PS、PMMA 膜に比べて活性型白血球の吸着を多く認め、PMMA 膜では血小板の吸着を多く認めた。タンパク量解析では、AN69ST 膜 1222mg/m<sup>2</sup>、PMMA 膜 493mg/m<sup>2</sup>、PS 膜 433mg/m<sup>2</sup> の吸着を認めた。二次元電気泳動および TOF/MS 解析を行った結果、各膜に特徴的なタンパクの吸着を認めた。ケミカルメディエータの解析を行った結果、AN69ST 膜では IL-17、Eotaxin、IP-10、MIP-1 $\beta$ 、MCP-1、PMMA 膜では IP-10、MIP-1 $\beta$ 、PS 膜では IL-17、IP-10 が多く吸着していた。特に AN69ST 膜ではケモカインの吸着を多く認めた。

(考察) 中空糸への血球吸着を比較した結果、AN69ST 膜で活性型白血球の吸着を多く認めた。重症敗血症では活性化好中球からエラスターゼや活性酸素種が大量に放出され血管内皮細胞や実質細胞を障害することが知られており、吸着除去は生体に対して有効となる可能性も考えられる。次に、膜に吸着したタンパク量および同定を行った結果、各膜に特徴的なタンパク吸着を認めた。これは、膜表面の陰性荷電の違いやイオン結合、疎水結合の違いにより大きく異なると考える。ケミカルメディエータの解析では、どの膜もサイトカイン以上にケモカインの吸着を多く認めた。敗血症症例で高サイトカイン血症に対して、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  などを吸着除去することで生命予後の改善につながる可能性があるとする報告もあるが、今回の検討から、他のメディエータを吸着することによる効果も考えられる。しかし、膜への吸着除去は、生体にとって有益な物質まで除去する可能性も示唆された。

(結語) AN69ST 膜は PMMA 膜や PS 膜に比べて、吸着タンパク量が多く、活性化好中球の除去能が高い事が示唆された。また、各膜種において付着するタンパクに差異が認められた。これらの違いが、生存率等の予後に影響を与える可能性が示唆された。