

学位論文

「ブタ血液を使用した急性血液浄化用血液濾過器ライフタイム
評価モデルの構築と
構築したモデルを用いた血液濾過器の評価」

DM13016 栗原 佳孝

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
医療工学群 臨床工学特論
指導教授 小林 弘祐

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

【背景・目的】急性血液浄化療法は集中治療室などにおいて急性腎不全などの重症患者に数日間連続して施行される治療法である。施行中に血液濾過器（以下、フィルタ）の血液凝固により、緊急の交換が必要になることがある。緊急の交換は患者の失血や感染のリスクがあり、またスタッフの負荷も増加するため、フィルタ使用可能時間（フィルタライフタイム）は24時間以上が望ましい。臨床においては、患者の治療開始時の病態が異なることや治療中に患者の病態が変化することなどの要因のため、基礎性能としてのフィルタライフタイムを比較検討することは難しい。そこで本研究では、同一条件下で、膜の細孔の目詰まりによってフィルタライフタイムを比較検討できる *ex vivo* 実験モデルを構築し、構築したモデルを使用して中空糸内径や膜面積を変化させることでフィルタライフタイムや蛋白除去性能が変化するかどうかを比較検討することを目的とした。

【方法】①実験モデルに使用する予定の購入した血液（購入血液）と生きているブタから採取した直後の血液（新鮮血液）の凝固・線溶系マーカーの比較検討を実施した。②実験モデルの構築では血液は購入血液を、フィルタはポリメチルメタクリレート膜（PMMA膜）のCH-1.0Nを使用し、臨床で用いられる条件とほぼ同様の条件で持続血液濾過（CHF）を実施した。血液流量は100 mL/min、補充液および濾液流量は10 mL/min、抗凝固剤（メシル酸ナファモスタット）の注入速度は、初回ボーラス20 mg、持続20 mg/hとした。臨床とは異なり血液が常に血液回路や血液貯留部（以下、血液バッグ）と接触しており凝固が起こりやすいため、補充液に抗凝固剤としてクエン酸三ナトリウムを追加で添加し、その濃度を0, 6, 7, 8, 10 mMと変化させ、フィルタライフタイムを評価した。評価項目は、①実験モデルの安定性を確認するために実験中のヘマトクリット値（Ht）②蛋白除去性能として総蛋白濃度（TP）、③圧力の経時変化として、中空糸の細孔の目詰まりを評価するために膜間圧力差（TMP）と中空糸自体の詰まりを評価するためにフィルタの入口圧と出口圧の差（AV差圧）の経時変化、またTMPとAV差圧の1時間当たりの変化の値（dP/dt）、④ライフタイムとしてTMPが200 mmHgに達した時間とTMPのdP/dtが15 mmHg/h以上上昇した時間、AV差圧が200 mmHgに達した時間とAV差圧のdP/dtが15 mmHg/h以上上昇した時間とした。③構築したモデルを使用し、一頭から採取した血液を1 Lずつ3つに分け、同時に同条件にて実験を行った。フィルタには、中空糸内径200 μ m、膜面積1.0 m²のCH-1.0N、中空糸内径240 μ m、膜面積1.0 m²のCH-1.0W、中空糸内径240 μ m、膜面積1.8 m²の3種類を使用した。クエン酸三ナトリウム濃度は7 mMとし実験を施行した。それ以外の操作条件は②と同様な方法で実験を実施した。評価項目は②の項目に加え、②の蛋白除去性能として濾液中に含まれる総蛋白濃度、PMMA膜に吸着された総蛋白濃度を評価した。また、③圧力の経時変化として圧力が上昇せず安定している時のTMPとAV差圧の経時変化を評価した。

【結果】①新鮮血液に比べ購入血液は、TATが有意に高値を示した。また、新鮮血液に比べ購入血液がATIII、TAT、Total PAI-1の項目においてばらつきが大きくなった。一方、Dダイマーにおいては、購入血液に比べ新鮮血液でばらつきが大きかったが、両項目ともヒトの基準値以内であった。②実験中のHtは急激な低下がなく、TPはすべての実験において同じように経時的に低下した。TMPとTMPのdP/dt、AV差圧、AV差圧のdP/dtは循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての結果で急激に上昇した。クエン酸三ナトリウムの濃度が高いほど、TMPが200 mmHgに達するまでの時間やTMPのdP/dtが15 mmHg以上上昇した時間、AV差圧が200 mmHgに達するまでの時間、AV差圧が15 mmHg/h以上上昇する時間が延長した。また、7 mM、8 mMのフィルタライフタイムは、TMPから評価したフィルタライフタイムがAV差圧か

ら評価したフィルタライフタイムに比べ有意に短かった。③実験中の Ht は急激な低下がなかった。TP は中空糸内径が太い CH-1.0W と CH-1.8W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に低値を示した。濾液中に含まれる総蛋白量においては 3 種類のフィルタ間に有意な差はみられなかった。PMMA 膜に吸着された総蛋白量は中空糸内径が太い CH-1.0W と CH-1.8W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に高値を示した。TMP と TMP の dP/dt、AV 差圧、AV 差圧の dP/dt は循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後はほぼすべての結果で急激に上昇した。TMP が 200 mmHg に達するまでの時間や TMP の dP/dt が 15 mmHg 以上上昇した時間、AV 差圧が 200 mmHg に達するまでの時間は膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N や CH-1.0W に比べ有意に延長した。AV 差圧が 15 mmHg/h 以上上昇する時間は、CH-1.8W が CH-1.0N に比べ有意に延長した。また、圧力が安定している時の TMP の経時変化は膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N や CH-1.0W に比べ有意に低値を示した。一方、圧力が安定している時の AV 差圧は、膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N や CH-1.0W に比べ有意に低値を示した。それに加えて、同じ膜面積でも中空糸内径が太い CH-1.0W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に低値を示した。

【考察】①購入血液は新鮮血液に比べ凝固系が活性化している血液もあり、購入血液が新鮮血液よりもばらつきも多くあった。これに対する対応策として、1 頭から採取した血液を数種類に分け、同時に異なるフィルタや操作条件で実験を実施することや、実験開始時に凝固・線溶系マーカを測定し、凝固・線溶系が大きく亢進している血液は除外をする方法を実施することで、購入血液を使用してもフィルタライフタイムを比較検討することが可能であると考えられた。②クエン酸三ナトリウムの濃度が 0 mM と 6 mM のとき、血液バッグやチャンバなどフィルタ以外の場所で凝固が起り、フィルタライフタイムも短かった。血液凝固が起きやすい血液となっており、フィルタライフタイム評価に使用するのは難しいと考えられた。一方、10 mM ではフィルタライフタイムが 48 時間を超えており、溶血などが起り始めるため、フィルタライフタイムを評価することは難しいと考えられた。7 mM もしくは 8 mM のときの血液バッグやチャンバなので凝固が起らず、フィルタライフタイムが 48 時間を超えている血液も 8 mM の 12 回中 1 回のみであり、フィルタライフタイムを評価するモデルとして適していると考えられた。また、TMP から評価したフィルタライフタイムが AV 差圧から評価したフィルタライフタイムに比べ有意に短かったことから、本モデルは、フィルタ内の中空糸の細孔の目詰まりが起り、その後中空糸自体が詰まるモデルであると考えられた。③PMMA 膜に吸着された総蛋白量は中空糸内径が太い CH-1.0W と CH-1.8W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に高値を示した。これは、中空糸内径が異なる中空糸では、細孔径分布など中空糸自体の構造が異なることで、中空糸の吸着特性が異なる可能性が考えられた。また、フィルタライフタイムは膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N や CH-1.0W に比べ有意に高値を示した。これは、中空糸の膜面に形成される濃度分極層の膜面濃度が高くなるほど、中空糸の細孔の目詰まりが起きやすいと考えられており、実際にシミュレーションより計算したところ、膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N や CH-1.0W に比べ膜面濃度が有意に低値を示したことから膜面濃度の影響を受けたと考えられた。

【結語】購入したブタ血液を使用し、クエン酸三ナトリウムを 7 mM もしくは 8 mM で添加することで、一定条件下でフィルタライフタイムを評価可能な ex vivo CHF 実験モデルを構築できた。構築したモデルを用いて、3 種類の PMMA 膜のフィルタを比較したところ、フィルタライフタイムは、膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N と CH-1.0W に比べ、有意に高値を示した。一方、血中総蛋白濃度は中空糸内径が太い CH-1.0W と CH-1.8W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に低値を示した。

	頁
3-3-8. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタの TMP から算出した dP/dt の経時変化	58
3-3-9. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタの TMP から算出した dP/dt が 15 mmHg/h 以上に上昇した時間の比較	59
3-3-10. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタの AV 差圧の経時変化	60
3-3-11. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタの AV 差圧が安定している時間の比較	61
3-3-12. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタの AV 差圧が 200 mmHg に達した時間の比較	62
3-3-13. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタの AV 差圧の dP/dt の経時変化	63
3-3-14. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタの AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h 以上上昇した時間	64
 4. 考察	
4-1. 新鮮血液と購入血液における血液凝固マーカの比較	65
4-2. 購入血液を使用し、CHF を模擬した長時間 ex vivo 実験モデルの構築	67
4-3. 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタのライフタイムや蛋白除去性能の検討	73
 5. 総括	80
 6. 謝辞	81
 7. 引用文献	82
 8. 業績目録	84

1 序論

急性血液浄化療法は、集中治療室などにおいて腎機能が悪化した症例などに対する腎代替療法として、数日間連続的に施行される治療法であり、現在の集中治療分野において必要不可欠な高度医療である。

急性血液浄化療法の1つである、持続血液濾過（Continuous Hemofiltration : CHF）は患者から血液をローラーポンプにて脱血を行い、持続緩徐式血液濾過器（以下、フィルタ）を通過し、患者に血液を戻す治療法である（図1-1）。フィルタでは、濾過による血液中の老廃物や炎症物質などの溶質の除去および、患者の体内の過剰な水分の除去が行われる。その後、濾過で除去された体に有用な電解質を補填するために、補充液をフィルタ通過後に加える。また、治療中に血液が固まらないように、抗凝固剤を血液回路にある抗凝固剤添加ラインから投与する。

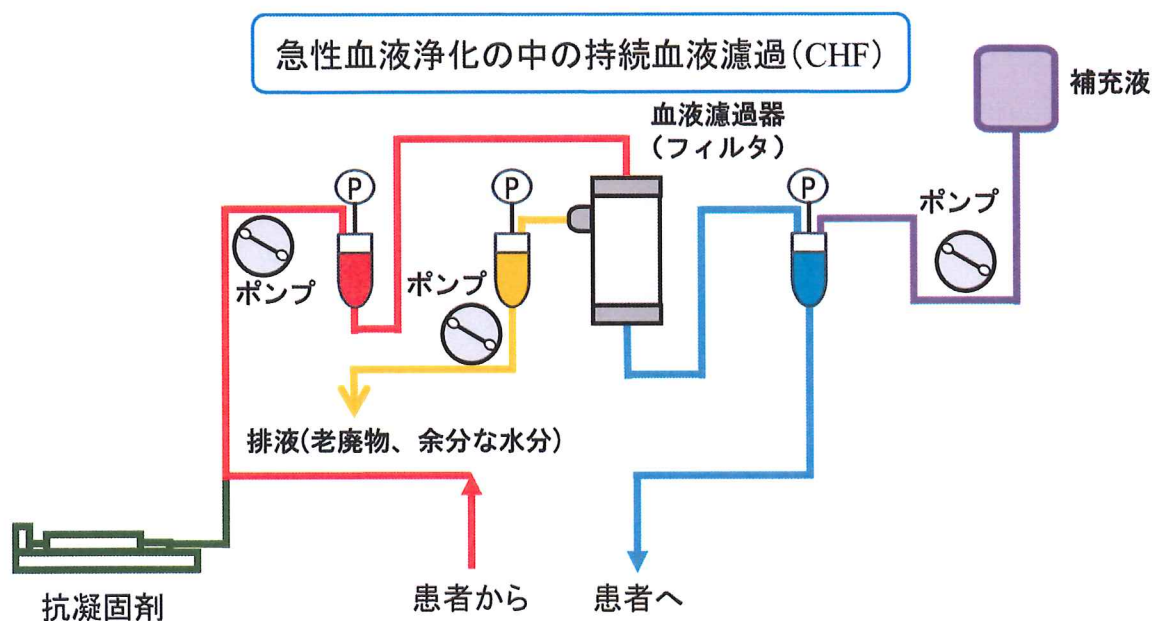


図1-1 持続血液濾過（CHF）の基本フロー図

フィルタには、中空糸と呼ばれるストローのような内径 200 μm 前後の円筒状の繊維が 1 万本前後入っている。中空糸には、細孔と呼ばれる 10~20 μm の穴が開いている。中空糸の中を血液が通り、細孔を介して溶質や水分の除去が行われ、中空糸の外側を除去された溶液が流れ、腎代替療法が行われる (図 1-2)。

中空糸の膜材質も様々な種類があり、拡散や濾過によって溶質を除去する膜材質 (Polysulfone : PS、polyether sulfone : PES など) と、拡散や濾過に加え膜材質に老廃物や炎症物質を吸着する膜材質 (Polymethyl methacrylate : PMMA など) があり、現在本邦の使用可能なフィルタを表 1-1 に示す。これ以外にも、以前まで製造販売されていたセプザイリスと同様の PAN 膜もあるが、吸着効果のないパンフローという商品であった。

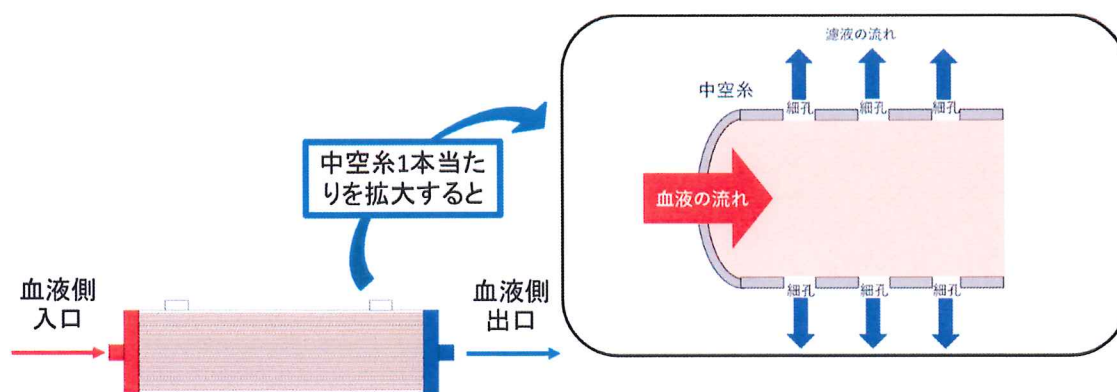


図 1-2 フィルタ及び中空糸の構造

表 1-1 本邦で現在使用できるフィルタの種類

商品名	メーカー	膜材質	除去原理
エクセルフロー	旭化成メディカル	PS膜	濾過
ヘモフィールSHG	東レ		
UTフィルター	ニプロ	CTA膜	
シェアフィルタ		PES膜	
ヘモフィールCH	東レ	PMMA膜	濾過に加えて吸着
セプザイリス	バクスター	PAN膜	

PMMA 膜は、膜材質に炎症性サイトカインを吸着するので、敗血症などの炎症性サイトカイン濃度が高値の患者に使用し^{1,2)}、3 日後に各種炎症性サイトカインが有意に低値を示すが²⁾、PMMA 膜以外では有意に低値を示さないこと³⁾が報告されている。また非吸着性の PAN 膜（パンフロー）に比べ吸着特性を示す PMMA 膜を使用することで、28 日間の累積生存率が高いこと⁴⁾、などが報告されている。このように PMMA 膜は炎症性サイトカインなどが吸着され生存率などを良好にしていることから、膜面積を増加させることで吸着量も増加させる検討も実施されている^{5,6)}。

急性血液浄化療法中に、フィルタの細孔の目詰まりや、中空糸自体の詰まりにより、緊急のフィルタ交換が必要になることがある。緊急のフィルタ交換は、患者の失血や感染のリスクがあり、またスタッフの仕事量も増加させるため、フィルタの使用可能時間（ライフタイム）は重要な基礎性能である。基礎性能としてのライフタイムを把握することができれば、臨床においてフィルタ選択の 1 つの指標になる。

フィルタのライフタイムを決定するフィルタ側の要因は、中空糸内径や膜材質、フィルタの設計条件（フィルタの縦横比や中空糸の充填率など・・・）などがある。

複数のフィルタのライフタイムを臨床において評価する場合、患者の治療開始時の病態が異なること、治療中に病態が変化すること、治療条件が異なるなどの要因で基礎性能としてのライフタイムを評価することは難しく、報告もさまざまである^{5,7)}。膜材質に吸着効果を持つ PMMA 膜は、目詰まりを起こしやすいフィルタで、吸着を持たない PAN 膜や CTA 膜と比較して治療モードによってはライフタイムが短いという報告⁸⁾がある一方、吸着効果を持つ PMMA 膜と吸着効果を持たない PS 膜とライフタイムは変わらないという報告⁹⁾もあり、これらの報告は、臨床でライフタイムを評価することの難しさを示していると考えられる。

そこで本研究では、動物血液を使用し、同一条件下で、膜の細孔の目詰まりによってフィルタライフタイムを比較検討できる *ex vivo* 実験モデルを構築し、構築したモデルを使用して中空糸内径や膜面積を変化させることでフィルタライフタイムや蛋白除去性能が変化するかどうかを比較検討することを目的とした。

2 方法

2-1 ブタ新鮮血液と購入血液の凝固・線溶系マーカの比較検討

本研究で使用する血液として、採血後数時間経過し、抗凝固剤、抗菌剤を投与した血液（購入血液）が使用可能か、購入血液と採血直後の血液（新鮮血液）の凝固系マーカを比較し検討することを目的とした。

2-1-1 使用機器

- ・遠心機（himac CF7D2：工機ホールディングス株式会社）
- ・オートクレーブ（MLS-3751：PHCホールディングス株式会社）
- ・滅菌済5Lプラスチックビーカー（アズワン株式会社）

2-1-2 使用物品

- ・採血直後のブタ血液（新鮮血液）
- ・購入ブタ血液（東京芝浦臓器株式会社）
- ・3.2%クエン酸ナトリウム0.2mL入り真空採血管（ベノジェクトII真空採血管：テルモ株式会社）
- ・ポリスピッツ（株式会社エスアールエル）
- ・シリンジ（10 mL、20 mL：テルモ株式会社）

2-1-3 使用試薬

- ・ペニシリン・ストレプトマイシン（Penicillin Streptomycin、15140-122：Gibco）

2-1-4 新鮮血液と購入血液の準備

新鮮血液は、本研究室の動物実験で使用するブタから、動物実験の当日に採血したものとした（医学部動物実験委員会承認番号 2014-140）。採血をしたブタは、実験前日と当日に抗血小板 2 剤療法（dual antiplatelet therapy : DAPT）が行われていた。抗血小板薬として、アスピリン 300 mg（アスピリン腸溶錠 100mg：日本ジェネリック）とクロピドグレル 150 mg（クロピドグレル硫酸塩製剤：サノフィ）が投与された。採血時のブタは、キシラジン 2.3~8.4 mg/kg（キシラジン注 2%：フジタ製薬）、アトロピン 0.5 mg（アトロピン硫酸塩注 0.5mg/ml：田辺三菱製薬）、ケタミン 10.2~35.6 mg/kg（ケタラール筋注用 50mg/ml：第一三共）、2%プロポフォール（2%プロポフォール注：丸石製薬）で麻酔後、人工呼吸管理（FiO₂ 35%）されていた。動物実験中に右頸動脈より採血した。

購入血液は、東京芝浦臓器より購入した屠殺血（抗凝固剤としてクエン酸 3 ナトリウム 10 mM 添加済み）とした。血液を購入後すぐに冷却保存し、可能な限り揺らさないように運搬した。大学到着後、購入血液を滅菌済の 5 L のプラスチックビーカーに、購入血液が活性化しないように移した。その後、購入血液の細菌繁殖や腐敗を防ぐ目的として、抗生剤を血液 1mL に対し、ペニシリンとストレプトマイシンの混合液（ペニシリン 100 Units、ストレプトマイシン 100 µg）を投与した。

新鮮血液、購入血液ともに採取後、3.2%クエン酸ナトリウム 0.2mL 入り真空採血管に入れ、2500 G、4°C、10 分間遠心分離を実施し、血漿成分を採取し、専用の容器に入れ凍結保存した。

2-1-5 凝固系・線溶系マーカの測定

凝固系・線溶系マーカとして、アンチトロンビンⅢ (ATⅢ)、トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体 (TAT)、プラズミノゲンアクチベーター (total-PAI-1)、D ダイマーを測定した。測定は株式会社エスアールエルに委託した。ATⅢは発色性合成気質法、TAT は酵素免疫測定法、total-PAI-1 はラテックス近赤外免疫比濁法、D ダイマーはラテックス免疫比濁法で測定された。

ATⅢは肝臓で生成され、凝固カスケードの活性第X因子 (Xa) やトロンビンと結合し、その作用を阻害する抗凝固因子である。ATⅢが低下していると凝固が亢進していることが示す (図 2-1)。

TAT はトロンビンと ATⅢが結合した複合体であり、増加していると凝固が亢進していることを示す (図 2-1)。

Total PAI-1 は、血管内皮細胞の障害によって産生させるマーカであり、血液採取時に血管内皮細胞が障害されると増加するマーカである。

D ダイマーはフィブリンが溶解された成分であり、増加していると、凝固系カスケードが亢進し、線溶系カスケードも亢進していることを示す (図 2-2)。

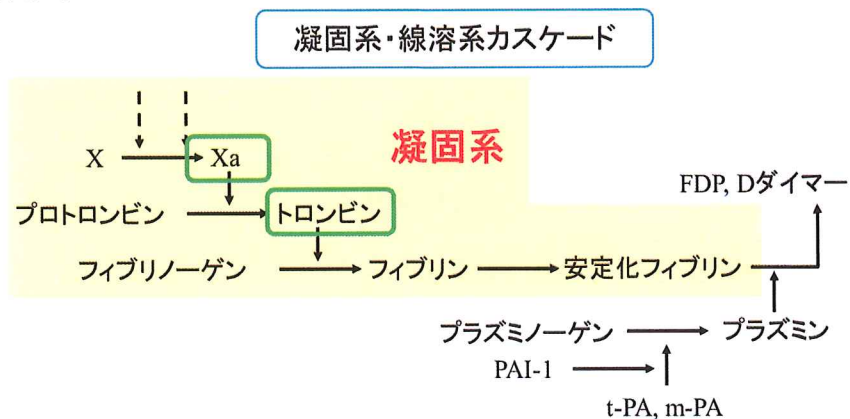


図 2-1 凝固系カスケード

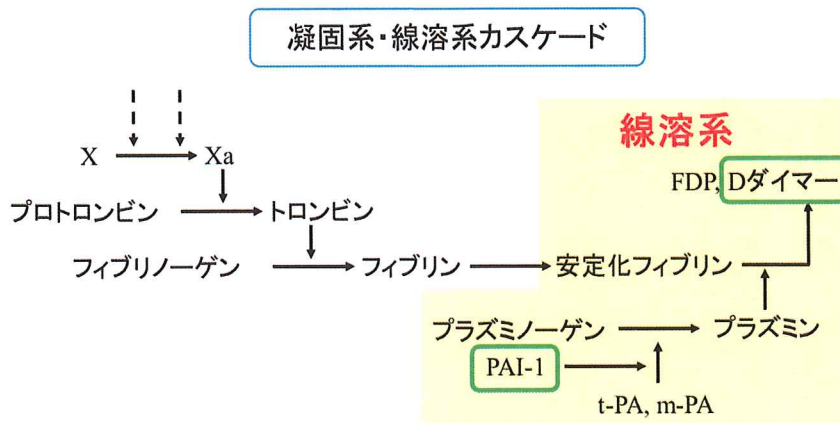


図 2-2 線溶系カスケード

2-2 購入血液を使用し、CHF 模擬した長時間 ex vivo 実験モデルの構築

購入血液を使用して CHF 循環実験を行い、血液浄化器（フィルタ）のライフタイムの評価するために、フィルタ以外でできるだけ凝固が起こらず、フィルタにある程度の凝固が発生するような条件を検討するため、補液内に抗凝固剤として、クエン酸三ナトリウムの濃度を変化させ、実験条件に適したクエン酸三ナトリウム投与量を比較検討することを目的とした。

2-2-1 使用機器

- ・ 屈折計 (SUR-JE : 株式会社アタゴ)
- ・ 恒温槽 (TR-1A : アズワン株式会社)
- ・ ロッキングミキサー (RM-300 : アズワン株式会社)
- ・ ヘマトクリット遠心機 (MC-150 : 株式会社トミー精工)
- ・ 卓上多本架遠心機 (LC-230 : 株式会社トミー精工)
- ・ 血液浄化用装置 (TR-525 または TR-55X : 東レ株式会社)
- ・ 動物用全自動血球計数器 (Celltaca MEK-6450 : 日本光電工業株式会社)
- ・ 吸引器
- ・ ヘマトクリットリーダー
- ・ ピペットマン 1000 μ L、200 μ L (GILSON)
- ・ 滅菌済 5 L プラスチックビーカー (アズワン株式会社)
- ・ 500 mL ガラスビーカー (柴田化学株式会社)
- ・ 電子天秤 (PB3002 : メトラー・トレド株式会社)
- ・ 200 mL プラスチックメスシリンダ (株式会社サンプラテック)
- ・ オートクレーブ (MLS-3751 : PHC ホールディングス株式会社)

2-2-2 使用物品

- ・ブタ血液（東京芝浦臓器株式会社）
- ・血液バッグ（腹水濾過濃縮再静注回路 FCB-03：旭化成メディカル株式会社）
- ・血液回路（多用途血液処理用血液回路 U-520, SZ-M：日本ライフライン株式会社）
- ・吸引濾過フィルタシステム（150 mL Filter System Nonpyrogenic Sterile Polystyrene：コーニングジャパン株式会社）
- ・シリンジ（5 mL、10 mL、20 mL、50 mL、20 mL ロック式、50 mL ロック式：テルモ株式会社）
- ・18G 注射針（テルモ株式会社）
- ・15 mL 遠沈管（CELLSTAR®：Greiner Bio-one）
- ・ヘマトクリット毛細管（ヘパリン 100 本入：ドラモント）
- ・Pipette Tube（QSP-111Q、QSP-W110-Q：サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）
- ・5 mL チューブ（ビオラモ 5 mL チューブ VIO-5B：アズワン株式会社）
- ・1.5 mL チューブ（TreffLab：Nolato Treff AG）
- ・持続緩徐式血液濾過器（フィルタ）（ヘモフィール® CH-1.0N：東レ株式会社、表 2-1）

※中空糸本数は以下式 2-1 を用いて計算した。

$$\text{算出中空糸本数} = \frac{S}{2\pi rL} \cdot \cdot \cdot (2 - 1)$$

（膜面積：S、中空糸半径：r、有効長：L）

表 2-1 CH-1.0N 詳細

	CH-1.0N
中空糸内径[μm]	200
膜面積[m ²]	1.0
有効長[cm]	19.5
ハウジング内径(実測値)[cm]	3.5
中空糸本数(計算値)	8,162

2-2-3 使用試薬

- ・ペニシリン・ストレプトマイシン (100mL、15140-122 : Gibco)
- ・ろ過型人工腎臓用補液 (サブラッド®血液ろ過用補充液 BSG : 扶桑薬品工業株式会社)
- ・生理食塩液 (大塚生食注 : 大塚製薬株式会社)
- ・メシル酸ナファモスタット (コアヒビター® : エイワイファーマ株式会社)
- ・5%ブドウ糖溶液 (大塚糖液 5% : 大塚製薬株式会社)
- ・くえん酸三ナトリウム二水和物 (191-01785 : 富士フィルム和光純薬株式会社)
- ・EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate 99+ (E5134) : シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社)

2-2-4 プライミング

プライミングは、すべて清潔操作で行った。フィルタにエアが可能な限り入らないように以下の手順でプライミングを実施した。循環回路は、フィルタ、動脈側回路、静脈側回路、濾液回路、補液回路で構成される（図 2-3）。

手順

1. 回路をすべて袋から出し、回路とフィルタを血液浄化装置に組み立てた。この時、補液ポンプおよび濾液ポンプのオクルージョンは開、血液ポンプのオクルージョンは閉とした。補液回路と静脈側回路を接続した（図 2-3：オレンジ○は接続）。この段階では、その他の各種回路とフィルタ、血液バッグは接続していない（図 2-3：緑および紫○の場所は未接続の状態）。動脈側回路圧力モニターラインと濾液回路圧力モニターラインは血液浄化装置の圧力センサに接続せず、両モニターラインの先端の三方活栓も開けたままにし、大気開放状態とした。それ以外の回路と血液浄化装置接続部は接続した（図 2-3：黄色○）。
2. 補液回路の補液点滴筒下を鉗子で止め（図 2-4：①）、生理食塩液（生食）に補液点滴筒先端を接続し、補液点滴筒を満たした。
3. 静脈側回路のドリップチャンバ下を鉗子で止め（図 2-4：②）、補液回路の補液点滴筒下の鉗子を外し（図 2-4：①）、落差方式で補液回路、静脈側回路のドリップチャンバ、フィルタ接続部まで生食で満たし、鉗子を止めた（図 2-4：③）。
4. 静脈側回路フィルタ接続部とフィルタ、および動脈側回路フィルタ接続部とフィルタを接続した（図 2-4：緑色○）フィルタの静脈側を上にしたまま鉗子を外し（図 2-5：③）、動脈側回路にプライミング溶液が出たら、再度、静脈側回路フィルタ接続部を鉗子で止め（図 2-5：③）、フィルタの動脈側が上になるようにフィルタを回転させた。
5. 動脈側回路フィルタ接続部の鉗子を外し動脈側フィルタ上部にある空気を動脈側回路に生食で押し流し、動脈側回路のドリップチャンバ半分まで満たし、補液ポンプのオクルージョンを閉めた。これで、補液側からの落差方式によるプライミングは終了となる。
6. 動脈側回路のプライミングラインの点滴筒下を鉗子で止め（図 2-6：④）、点滴筒先端を生食に接続し、点滴筒を満たした。
7. 動脈側回路のプライミングラインから、動脈側回路患者接続部先端まで生食を満たし鉗子で止めた（図 2-6：⑤）。
8. 血液ポンプを動かし、ドリップチャンバまでプライミングし、血液ポンプを一時停止し、動脈側圧力モニターラインを血液浄化装置の圧力センサに接続した。
9. 静脈側回路ドリップチャンバ下の鉗子を外し（図 2-6：②）、血液ポンプを再開し、静脈側回路接続部先端まで生食を満たし、血液ポンプを一時停止し、鉗子で止めた（図 2-6：⑥）。
10. 静脈側回路フィルタ接続部と濾液回路ドリップチャンバ下を鉗子で止め（図 2-7：③と⑦）、フィルタの濾液側ポートを外し、濾液回路と接続した（図 2-7：青色○）。

11. 血液ポンプを再開し、フィルタの血液側から濾液側および濾液回路のドリップチャンバまでプライミングし、濾液回路の圧力モニターラインを血液浄化装置の圧力センサに接続した。その後、濾液回路ドリップチャンバ下の鉗子（図 2-7：⑦）を外し、濾液回路先端までプライミングし、濾液ポンプのオクルージを閉めた。
12. 静脈側回路患者接続部先端と血液バッグ入口部を接続し鉗子を外し（図 2-8：⑩）、それ以外の血液バッグ接続部（図 2-8：⑪と⑫）はクランプした。
13. 血液・濾液・補液ポンプを動かし、各ポンプが問題なく稼働するか、アラームが鳴らないか等を確認しながら、生食がなくなるまでプライミングした。
14. 血液バッグと静脈側回路患者接続部の血液バッグ側もクランプし、静脈側回路患者接続部を外した。
15. 血液バッグ内の生理食塩液や空気をすべて除去し、最後にシリンジを使用し血液バッグ内の空気をできる限り除去した。
16. 動脈側血液回路のプライミングラインの下に鉗子を止めた（図 2-7：⑧）

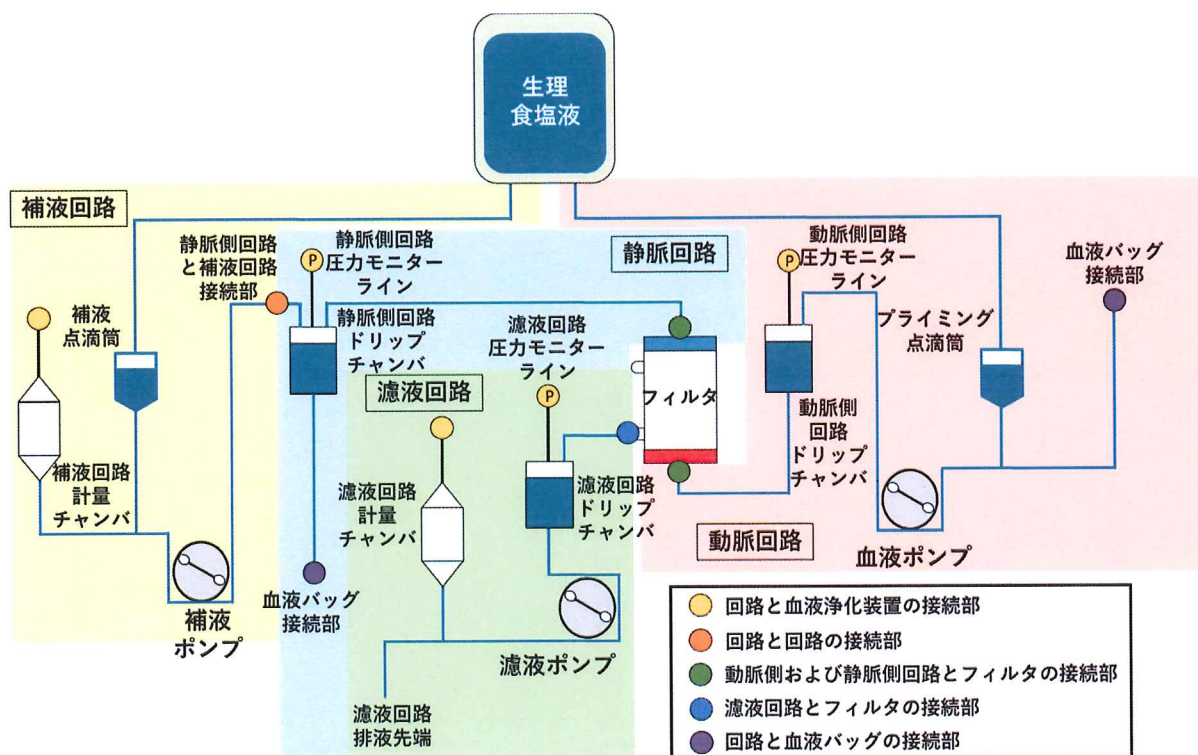


図 2-3 プライミング完成図

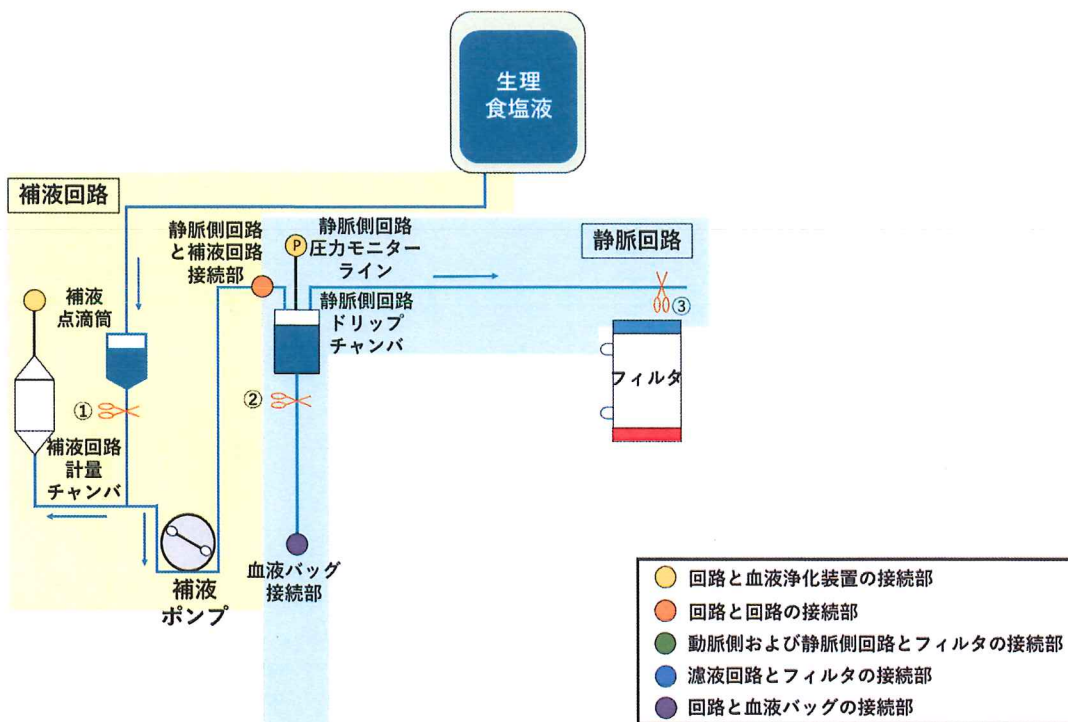


図 2-4 プライミング図 I

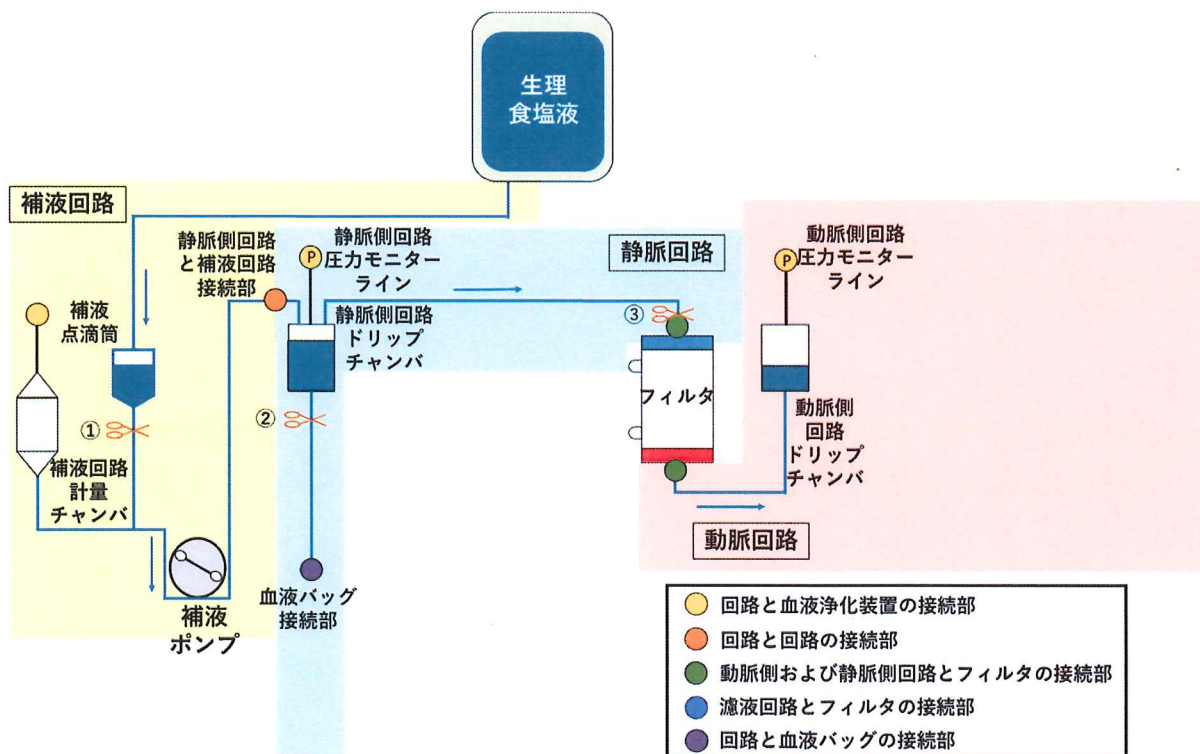


図 2-5 プライミング図 II

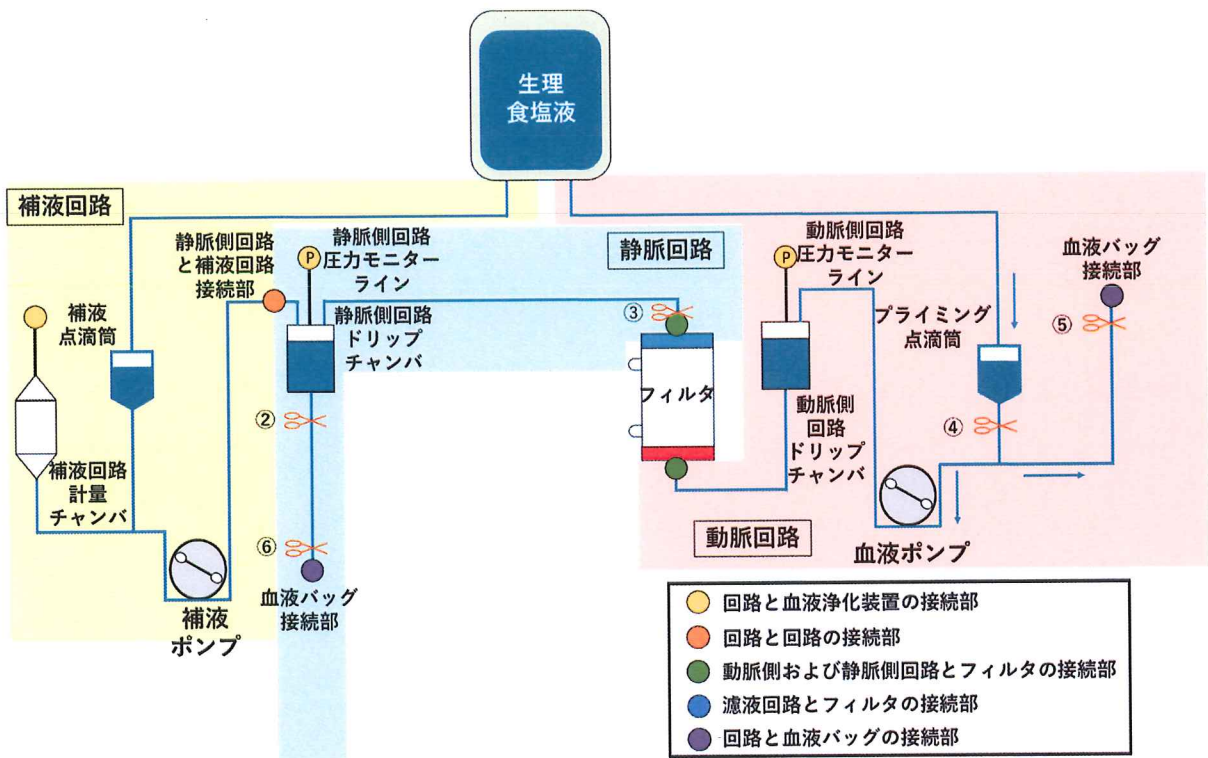


図 2-6 プライミング図Ⅲ

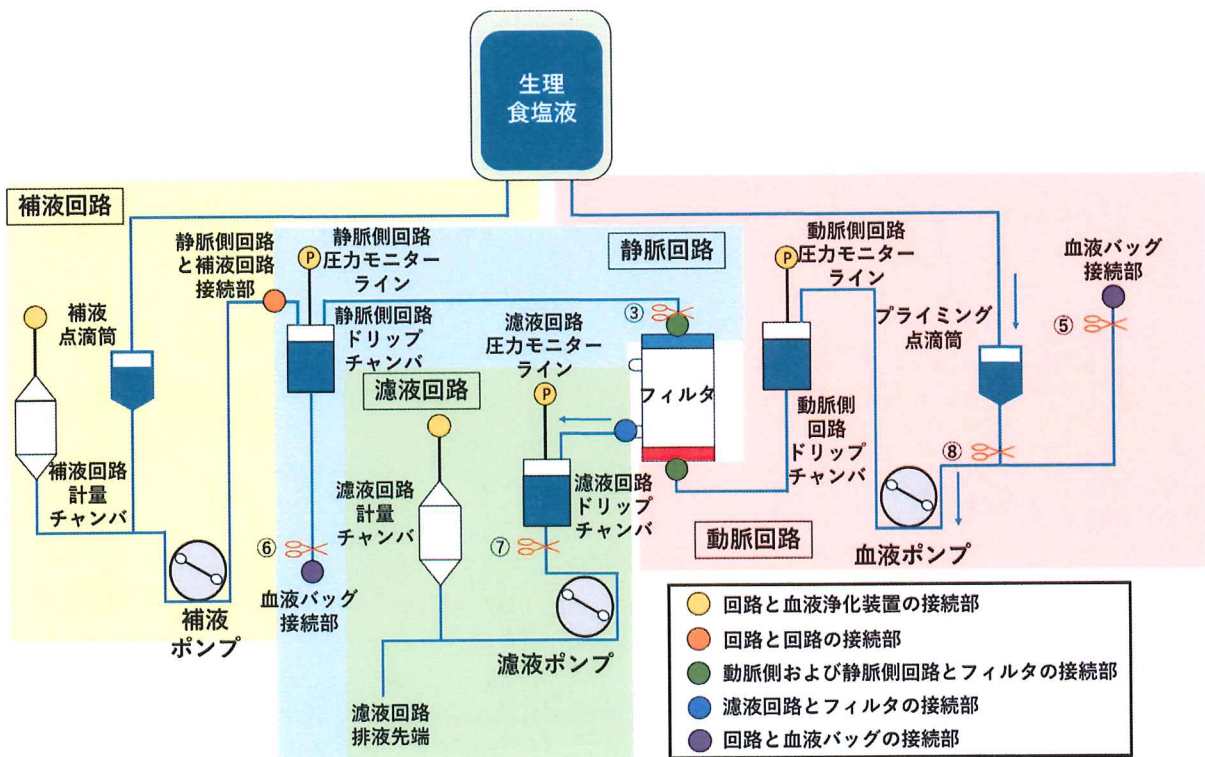


図 2-7 プライミング図Ⅳ

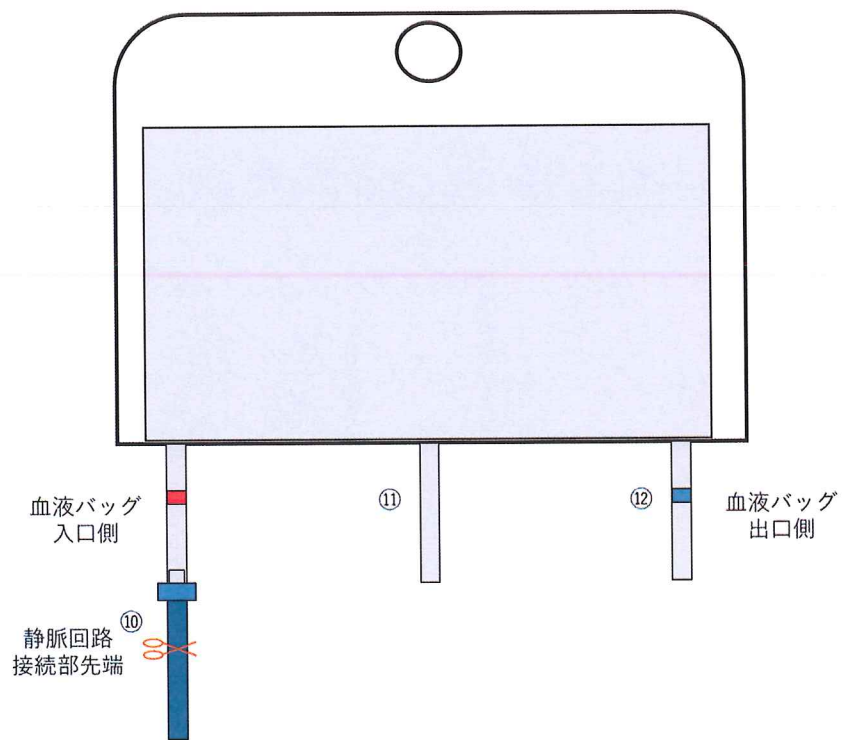


図 2-8 血液回路と血液バッグ接続

2-2-5 クエン酸三ナトリウム溶液とメシル酸ナファモスタット溶液の調製

クエン酸三ナトリウム溶液の調整

- 1、クエン酸三ナトリウムを 58.8 g 電子天秤にて測定し、500 mL のガラスビーカに入れた。
- 2、プラスチックメスシリンダで測定した 150 mL の生食をガラスビーカに入れ、溶解した。
- 3、完全に溶解した後、メスシリンダに溶液を入れた。
- 4、メスシリンダ内の溶液が 200 mL になるまで生食を加え、1 M のクエン酸三ナトリウム溶液を作製した。
- 5、その後、フィルタシステムと吸引器を使用し、クエン酸三ナトリウム溶液をフィルタ濾過滅菌し不純物を除去した (図 2-9)。

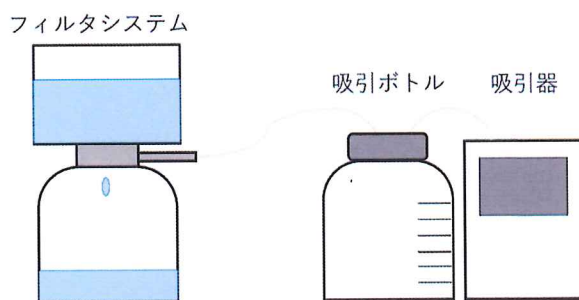


図 2-9 フィルタ濾過滅菌

メシル酸ナファモスタット溶液の調製

循環実験用に 10mg/mL メシル酸ナファモスタット溶液を調製した。メシル酸ナファモスタット溶液は血液回路の抗凝固ラインから注入し、回路内凝固防止目的として用いた。

調製方法 I メシル酸ナファモスタットを 100 mg のバイアルの場合

- ① 18G 注射針を接続した 20 mL ロック式シリンジに、5%ブドウ糖を 10 mL 分注した。
- ② 18G 注射針を分注したブドウ糖をメシル酸ナファモスタットバイアル (個体状態) 内に注入し、バイアル内で溶解し、溶解したメシル酸ナファモスタットをシリンジに戻した。

調製方法 II メシル酸ナファモスタットを 150 mg のバイアルの場合

- ① 18G 注射針を接続した 20 mL ロック式シリンジに、5%ブドウ糖を 15 mL 分注した。
- ② 18G 注射針を分注したブドウ糖をメシル酸ナファモスタットバイアル (個体状態) 内に注入し、バイアル内で溶解し、メシル酸ナファモスタット溶解したメシル酸ナファモスタットをシリンジに戻した。

循環実験は 48 時間行うため、メシル酸ナファモスタットの使用量は、実験経過時間や TMP や AV 差圧の圧力変化を見ながら、可能な限り廃棄が少ないように 2 種類のバイアルを選択し使用した。

2-2-6 血液置換方法

プライミングが完了後、血液回路内の生食をすべて取り除くため、ブタ血液で置換した。

手順

①血液回路の動脈側回路患者接続部をブタ血液が入ったビーカ内に入れ、血液流量 100 mL/min で 2 分間運転し、静脈側回路患者接続部出口側から、血液回路内の生食を廃液し、血液回路内を血液で完全に置換した (図 2-10 : A)。

②その後、血液回路の静脈側回路患者接続部を血液バッグの入口側に接続し、血液流量 100 mL/min で 8 分間運転し、血液バッグ内にブタ血液を 800 mL 貯留した (図 2-10 : B)。

③最後に、血液回路の動脈側回路患者接続部を血液バッグ出口側に接続した (図 2-10 : C)。

循環実験では、血液回路内の血液量 0.2 L と血液バッグ内 0.8L の合計 1 L の血液で実験を行った。

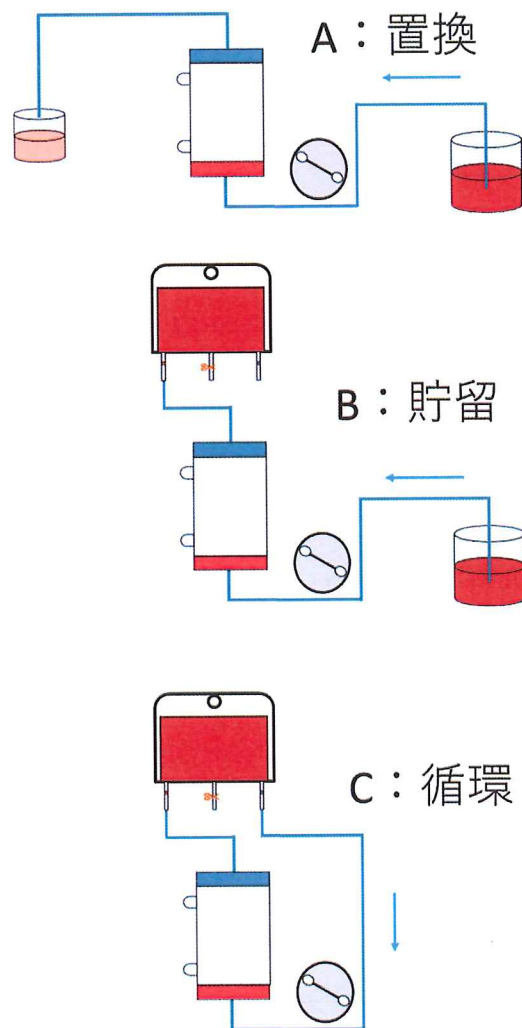


図 2-10 血液置換方法

2-2-7 循環実験

循環実験では、臨床の治療において体に該当する血液貯留部を血液バッグと見立て、貯留時にも異物と接し続けるので、凝固が起きやすい条件である。そのため、臨床で最も使用される抗凝固剤のメシル酸ナファモスタットに加え、補液のサブラッド内にクエン酸三ナトリウムを 0, 6, 7, 8, 10 mM のいずれかの濃度で添加し、補液と同時に抗凝固剤が添加される方法で実験を実施し、フィルタライフタイム評価に適したモデルを検討した。

実験対象群は、クエン酸三ナトリウムの濃度 0 mM 群、6 mM 群、7 mM 群、8 mM 群、10 mM 群の 5 群で行った。

- ① 補液のサブラッドのクエン酸三ナトリウムの濃度は表 2-2 のように調製した。

表 2-2 クエン酸三ナトリウム添加量

実験対象群	1 Mに溶解したクエン酸三ナトリウムをサブラッド内 (2020 mL) に添加する量
0 mM	0 mL
6 mM	12 mL
7 mM	14 mL
8 mM	16 mL
10 mM	20 mL

- ② 恒温槽にて 42°C に加温した温水を循環させたソフトバッグ (温水バッグ) を、血液バッグの上から覆い、血液バッグを 37°C に加温して実験を行った。また、血液バッグと温水バッグはロッキングミキサーに置き、30 回転/分で振盪しながら実験を実施した (図 2-11)。

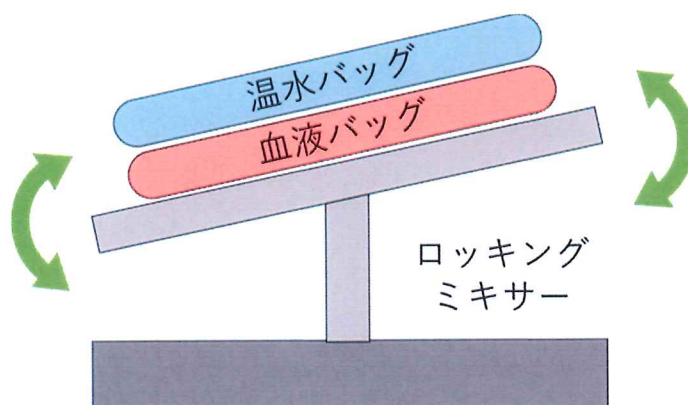


図 2-11 血液の振盪加温システム

- ③ 血液を置換した血液回路を循環させ実験開始とした (図 2-12、表 2-3)。

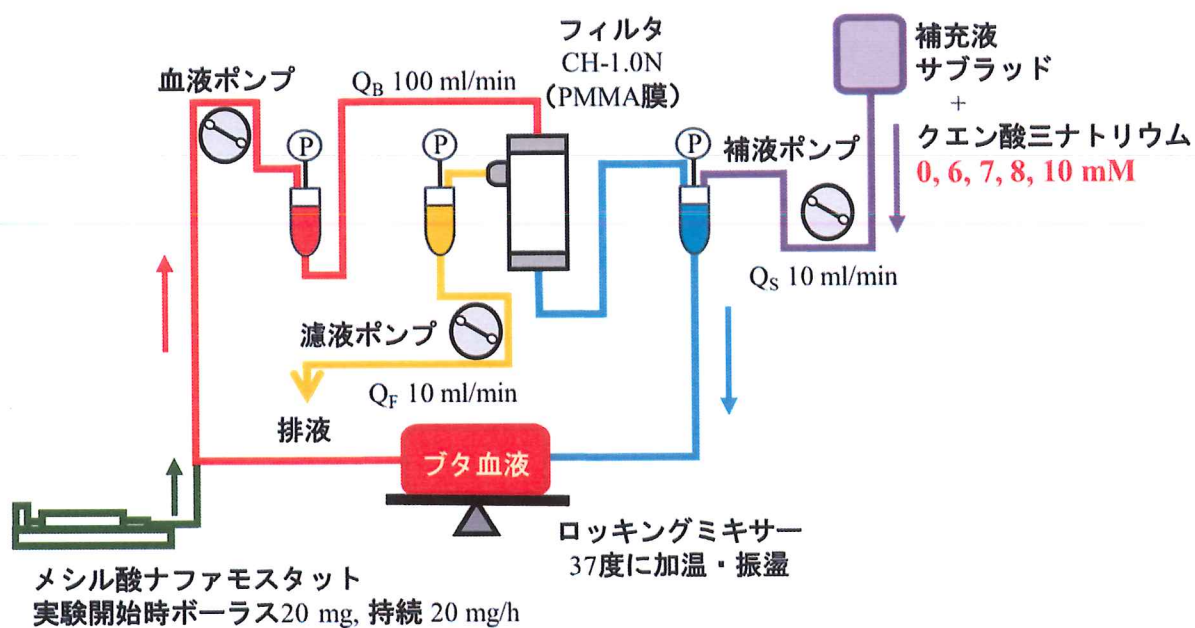


図 2-12 モデル構築時の循環実験回路

表 2-3 モデル構築時の実験条件

血液流量	100 mL/min
補液流量	10 mL/min
濾液流量	10 mL/min
メシル酸ナファモスタット投与速度	初回20 mg (2.0 mL) 持続20 mg/h (2.0 mL/h)

④ 循環実験中に採血と圧力の記録を行った (図 2-13)。

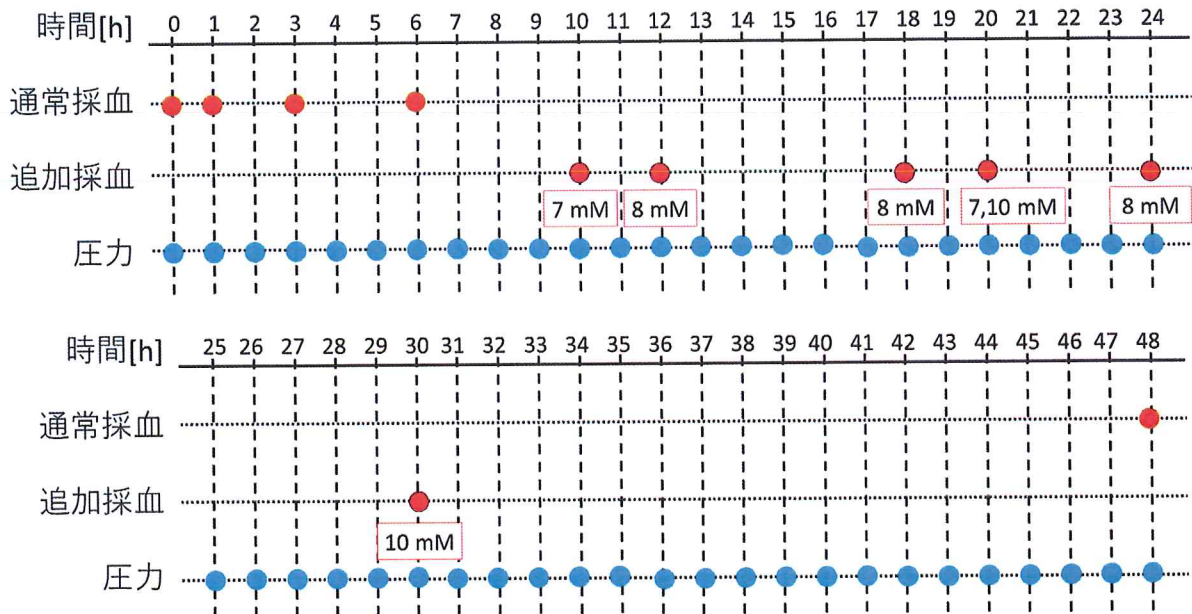


図 2-13 モデル構築時のサンプリングポイント

- ⑤ 採血は、実験共通の条件として、循環開始 (0) ,1,3,6,48 時間後で行った。採血量は各採血 5 mL とした。さらに、7 mM 群は実験開始から 10、20 時間後、8 mM 群では実験開始 12、18、24 時間後、10 mM 群では実験開始 20、30 時間後に追加で採血を行った。採血後は、血液のヘマトクリットと血中総蛋白濃度を測定した。
- ⑥ 圧力は、実験開始時から 1 時間間隔で血液浄化装置に表示されている入口圧、返血圧、ろ過圧を記録した。圧力変化が大きく起こっている時は、圧力を 6 分間隔で記録した。
- ⑦ 実験終了条件は、以下の 3 項目のうちいずれかが起こった時とした (表 2-4)。48 時間以内での実験終了は、実験終了の時点で採血と圧力を測定した。

表 2-4 実験終了基準

実験終了基準
TMP または 入口圧が 400 mmHg に達した場合
圧力が上昇せず血液回路や血液バッグなどで凝固が起こった場合
凝固が発生しなくても、血液の劣化や腐敗を考慮し実験開始から 48 時間経過した場合

2-2-8 評価項目

実験の評価は、以下の項目で行った。

- ① ヘマトクリット
- ② 血中総蛋白濃度
- ③ 膜間圧力差 (Transmembrane Pressure : TMP)
- ④ TMP の 1 時間当たりの変化 (dP/dt)
- ⑤ フィルタの入口圧と出口圧の差 (AV 差圧)
- ⑥ AV 差圧の 1 時間当たりの変化 (dP/dt)
- ⑦ フィルタライフタイム

① ヘマトクリット

サンプリングした血液を遠沈管に入れた。その血液から、ヘマトクリット毛細管を使用したマイクロヘマトクリット法もしくは自動血球計算器で測定した。

マイクロヘマトクリット法による測定

- ① ヘマトクリット毛細管を血液が入っている遠沈管の中に入れ、血液が毛細管の中に入ったら、Hemato-Seal™ で片側をふたをした。
- ② その後血液を Hemato-Seal™ が閉まっている側を外側につけ遠心器に入れ、12000 rpm、5 分間遠心分離を実施した (図 2-14)。遠心分離したヘマトクリット毛細管内は、血球成分と血漿成分に分離される (図 2-15)。
- ③ 遠心分離したヘマトクリット毛細管をヘマトクリットリーダに移し、毛細管の血液下部をヘマトクリットリーダの下の線に合わせ、血液上部をヘマトクリットリーダの上の線に合わせた。この時、ヘマトクリットリーダの上の線が毛細管の液面の中央部を通過させるようにした。その後、血球成分と血漿成分の分離部に真ん中の線を移動させた (図 2-14)。
- ④ ヘマトクリットリーダの線が毛細管の液面の中央部を通過させるようにした。その移動させた線上にある値 (図 2-16 赤丸) をヘマトクリットとして読み取った。

自動血球計算器による測定

- ① EDTA0.5 mM 入り生食を 0.5 mL にサンプリングした血液 0.5 mL を添加した溶液を動物用全自動血球計数器にて測定を実施した。
- ② EDTA 入り生食と血液を 1:1 で希釈しているため、得られた測定結果を 2 倍して評価した。

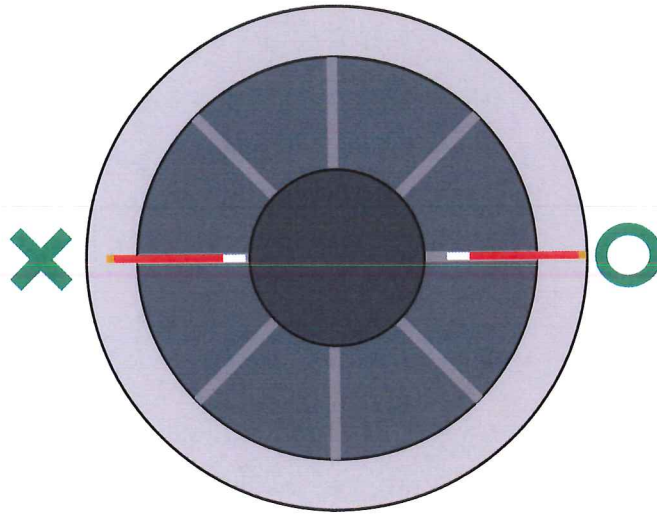


図 2-14 ヘマトクリット毛細管の遠心器入れ方

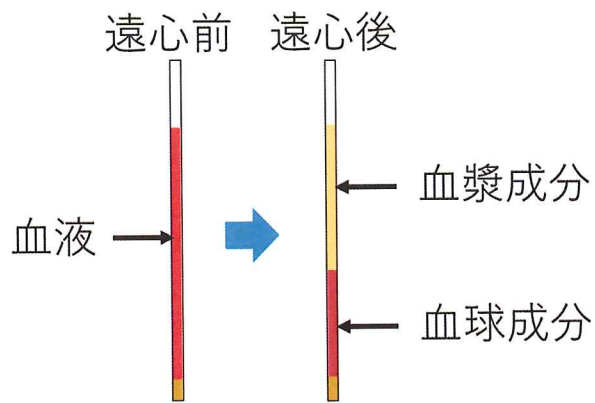


図 2-15 ヘマトクリット毛細管遠心前後

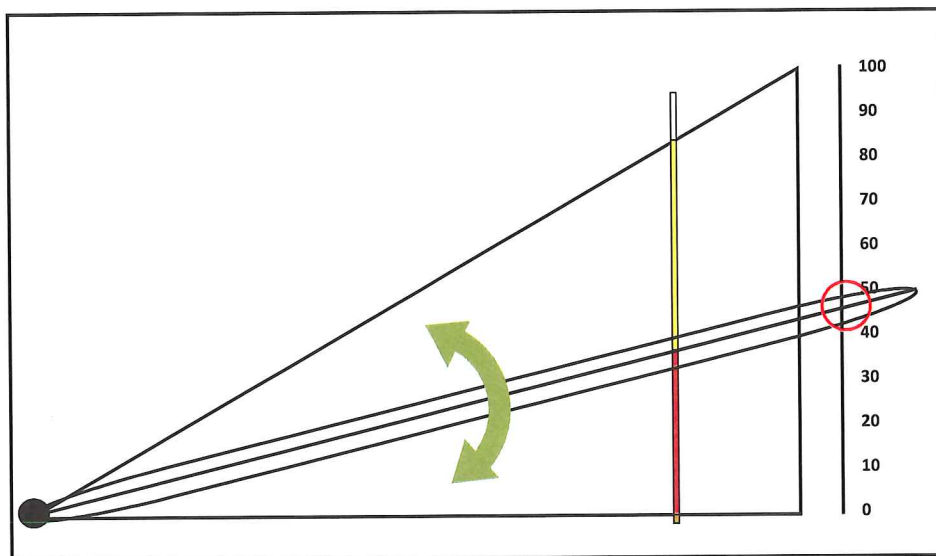


図 2-16 ミクロヘマトクリット法 測定方法

② 血中総蛋白濃度

血中総蛋白濃度の測定は、ヘマトクリットの測定時にサンプリングした血液を使用した。血液入りの 15 mL 遠沈管を遠心器にて 2500 rpm で 10 分間遠心分離を行った。屈折計の表示は、中央の目盛りが血中蛋白濃度を表している。サンプルの血漿を屈折計のガラス部に乗せ、ふたをすると、サンプルの血漿とそうでない部分の境界面ができる。その境界面と血中蛋白濃度の目盛が重なった場所の値が血中総蛋白濃度となる (図 2-17)。

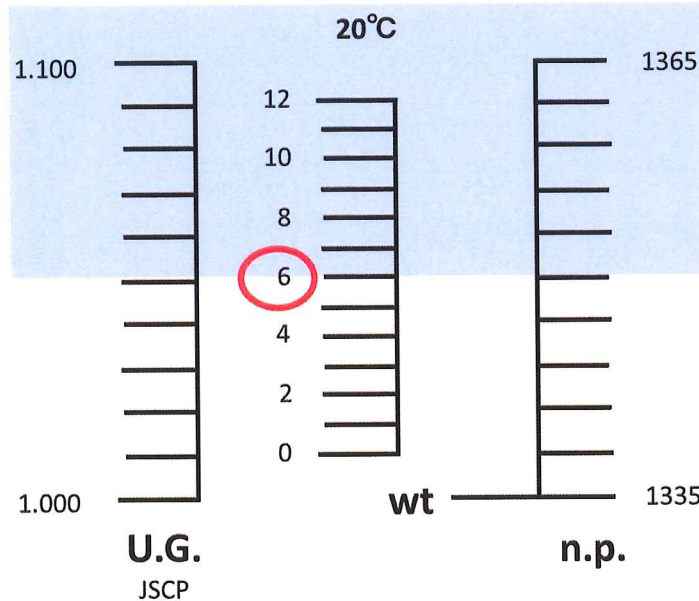


図 2-17 屈折計の目盛りの読み方 (血中総蛋白濃度が 6.0 g/dL の場合)

③ 膜間圧力差 (Transmembrane Pressure : TMP)

TMP は、血液浄化装置に表示される入口圧、返血圧、ろ過圧から、式 2-2 より算出した。

$$\text{TMP} = \frac{P_A + P_V}{2} - P_F \dots (2-2)$$

(入口圧 : P_A 、返血圧 : P_V 、ろ過圧 : P_F)

注) TMP も血液浄化装置に表示されるが、装置内で計算された値を表示しているため、表示されている TMP 算出に用いられた圧力と記録した圧力に時差が生じているので、採用しなかった。モニタしている圧力の値が -6~6 mmHg の範囲の時、血液浄化装置のモニタには 0 mmHg と表示される。そのため、0 mmHg と表示される圧力がある場合は、血液浄化装置に表示されている TMP の値を記録し、式 2-2 から 0 mmHg と表記されている圧力を計算により求めた。

④ TMP の 1 時間当たりの変化率 (dP/dt)

算出した TMP の結果と 1 時間前の TMP の結果の差を算出し、1 時間当たりの変化率 (dP/dt) とした。

⑤ フィルタの入口圧と出口圧の差 (AV 差圧)

AV 差圧は、血液浄化装置に表示される入口圧、返血圧から、式 2・3 を用いて算出した。

$$AV \text{ 差圧} = P_A - P_V \cdots (2-3)$$

(入口圧 : P_A 、返血圧 : P_V)

⑥ AV 差圧の 1 時間当たりの変化率 (dP/dt)

算出した AV 差圧の結果と 1 時間前の AV 差圧の結果の差を算出し、1 時間当たりの変化率 (dP/dt) とした。

⑦ フィルタライフタイム

フィルタのライフタイムにより、膜の細孔の目詰まりと中空糸自体の詰まりを評価した。中空糸の細孔の目詰まりは、中空糸の細孔が蛋白質などで目詰まりが起こることである。細孔の目詰まりが起こると、水分や溶質を除去するためにより高い圧力が必要になり、結果としてTMPが上昇する（図 2-18）。よって、中空糸の細孔の目詰まりは、TMPで評価できる。膜の細孔の目詰まりし始めた時間をTMPの1時間当たりの変化率（dP/dt）が15 mmHg/h以上上昇した時間として評価した。また、膜の細孔が目詰まりした時間として、TMPが200 mmHgに達した時間で評価した。

中空糸自体の詰まりとは、中空糸自体が血液成分によって詰まることである。中空糸自体の詰まりが起こると、血液自体が流れる流路の抵抗がより高くなり、結果として入口圧と出口圧の差（AV差圧）が上昇する（図 2-19）。よって、中空糸自体の詰まりは、AV差圧で評価できる。中空糸自体が詰まりし始めた時間をAV差圧の1時間当たりの変化率（dP/dt）が15 mmHg/h以上上昇した時間として評価した。また、中空糸自体が詰まった時間として、AV差圧が200 mmHgに達した時間で評価した。

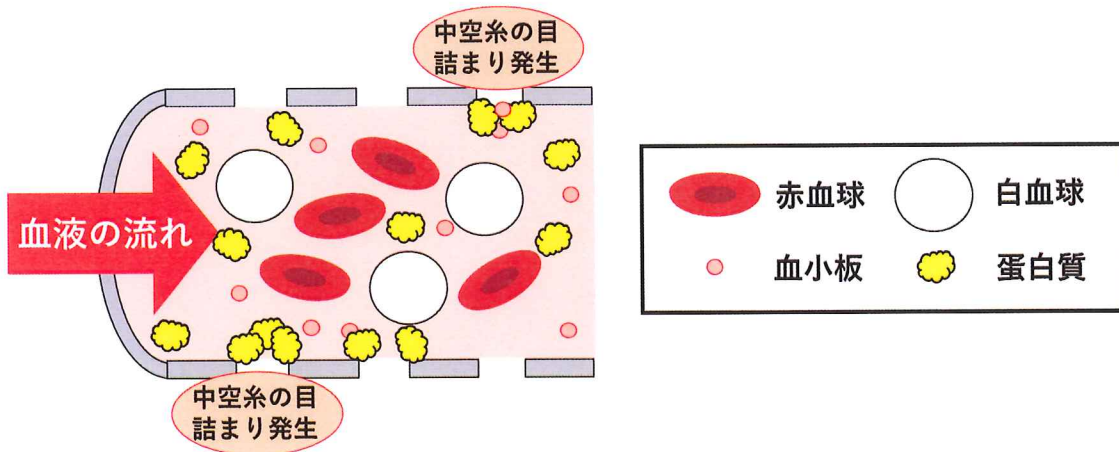


図 2-18 フィルタの細孔の目詰まり

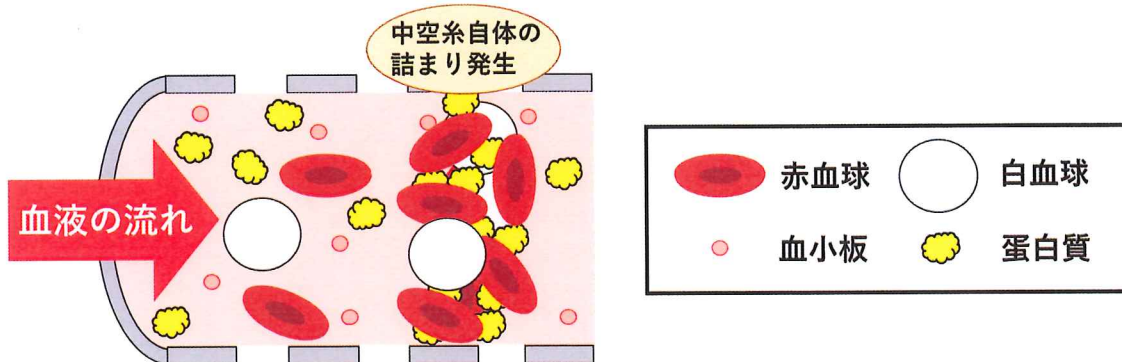


図 2-19 フィルタの中空糸自体の詰まり

200 mmHg に達した時間の求め方 (TMP、AV 差圧共通)

- ① 実験結果から、200 mmHg 前後の値 (A と B) とその時の循環開始からの経過時間 (A' と B') を抽出した (図 2-20)。
- ② 抽出した区間が直線的であると仮定し、200 mmHg に達した時間を式 2-4 で計算した。

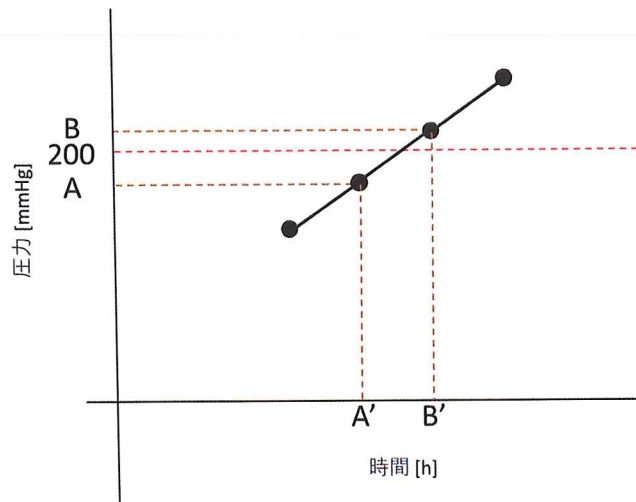


図 2-20 200 mmHg に達した時間の求め方

$$200 \text{ mmHg に達した時間} = A' + (200 - A) \times \frac{B' - A'}{B - A} \dots (2-4)$$

2-3 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのライフタイムや蛋白除去性能の検討

構築したモデルを使用して中空糸内径や膜面積の違いがフィルタライフタイムや蛋白除去性能に与える影響を比較検討することを目的とした。

2-3-1 使用機器

2-2-1と同様の使用機器で実験を実施した。

2-3-2 使用物品

試験管・フィルタ以外は、2-2-2と同様の使用物品で実験を実施した。

- ・試験管（アズワン株式会社）
- ・持続緩徐式血液濾過器（フィルタ）（ヘモフィール® CH-1.0N、CH-1.8W：東レ株式会社、CH-1.0W（東レ試作品）、表 2-5）

表 2-5 CH-1.0N、CH-1.0W、CH-1.8W の設計条件

	CH-1.0N	CH-1.0W	CH-1.8W
中空糸内径[μm]	200	240	
膜面積[m^2]	1.0		1.8
有効長[cm]	19.5		
ハウジング内径 (実測値)[cm]	3.5	4.0	5.5
中空糸本数 (計算値)	8,162	6,801	12,243

2-3-3 使用試薬

2-2-3と同様の実験試薬で実験を実施した。

追加項目として、

- ・マイクロ TP テストワコー（富士フィルム和光純薬株式会社）

2-3-4 プライミング

2-2-4と同様の同様な方法でプライミングを実施した。

2-3-5 クエン酸三ナトリウム溶液とメシル酸ナファモスタット溶液の調製

2-2-5 と同様の方法でクエン酸三ナトリウムとメシル酸ナファモスタットを調整した。

2-3-6 血液置換方法

2-2-6 と同様の方法で血液置換を実施した。

2-3-7 循環実験

今回の検討では、中空糸内径や膜面積の違いがフィルタのライフタイムに与える影響を検討するため、中空糸内径 200 μm 、膜面積 1.0 m^2 の CH-1.0N と中空糸内径 240 μm 、膜面積 1.0 m^2 の CH-1.0W と中空糸内径 240 μm 、膜面積 1.8 m^2 の CH-1.8W の 3 種類のフィルタを、1 頭から採取した血液を 3 つに分け、同条件で実験を施行し、比較検討した。

- ① 実験 2-2 で構築したモデルのクエン酸三ナトリウム濃度の検討結果より、今回の検討でサブブラッドの中に添加するクエン酸三ナトリウムの濃度は 7 mM を使用して実験を施行した。
- ② 実験 2-2-4 の②と同様に、血液バッグはロッキングミキサーに置き、その上加温バッグを置き、加温振盪しながら実験を実施した。
- ③ 血液を置換した血液回路を循環させ実験開始とした (図 2-21、表 2-6)。
- ④ 循環実験中に採血と濾液のサンプリングおよび圧力の記録を行った (図 2-22)
- ⑤ 採血は、循環開始直後、1, 3, 6, 10, 20, 30, 48 時間後で行った。採血量は各採血 5 mL とした。採血後は、血液のヘマトクリットと血中総蛋白濃度を測定した。今回の検討では、ヘマトクリットと血中総蛋白濃度は実験開始直後を 0 時間として検討した。加えて、血中総蛋白濃度は、実験を開始する前のビーカ内を前として検討した。
- ⑥ 圧力は、実験開始時から 1 時間間隔で血液浄化装置に表示されている入口圧、返血圧、ろ過圧を記録した。圧力変化が大きい時は、圧力を 6 分間隔で記録した。ろ過圧が 0 mmHg と表記されている時には、血液浄化装置に表示されている TMP の値を記録した。
- ⑦ 実験終了条件は、実験 2-2-4 の⑦と同様に表 2-4 に示す基準で行った。48 時間以内での実験終了は、実験終了の時点で採血と濾液のサンプリングおよび圧力を測定した。

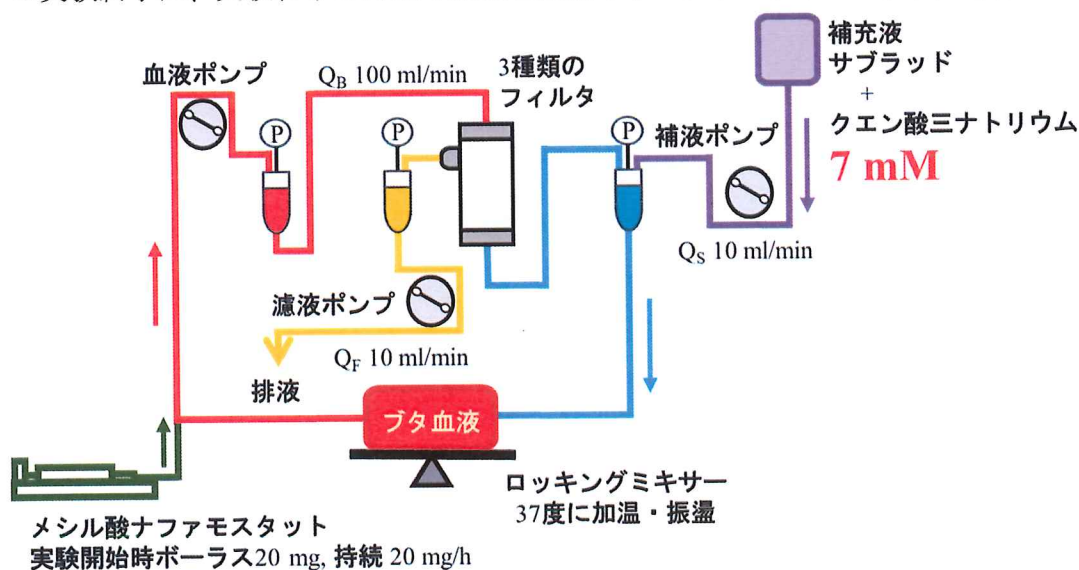


図 2-21 中空糸内径や膜面積の違いの検討時の循環実験回路

表 2-6 中空糸内径や膜面積の違いの検討時の実験条件

血液流量	100 mL/min
補液流量	10 mL/min
濾液流量	10 mL/min
クエン酸三ナトリウム濃度	7 mM
メシル酸ナファモスアット投与速度	初回20 mg (2.0 mL) 持続20 mg/h (2.0 mL/h)

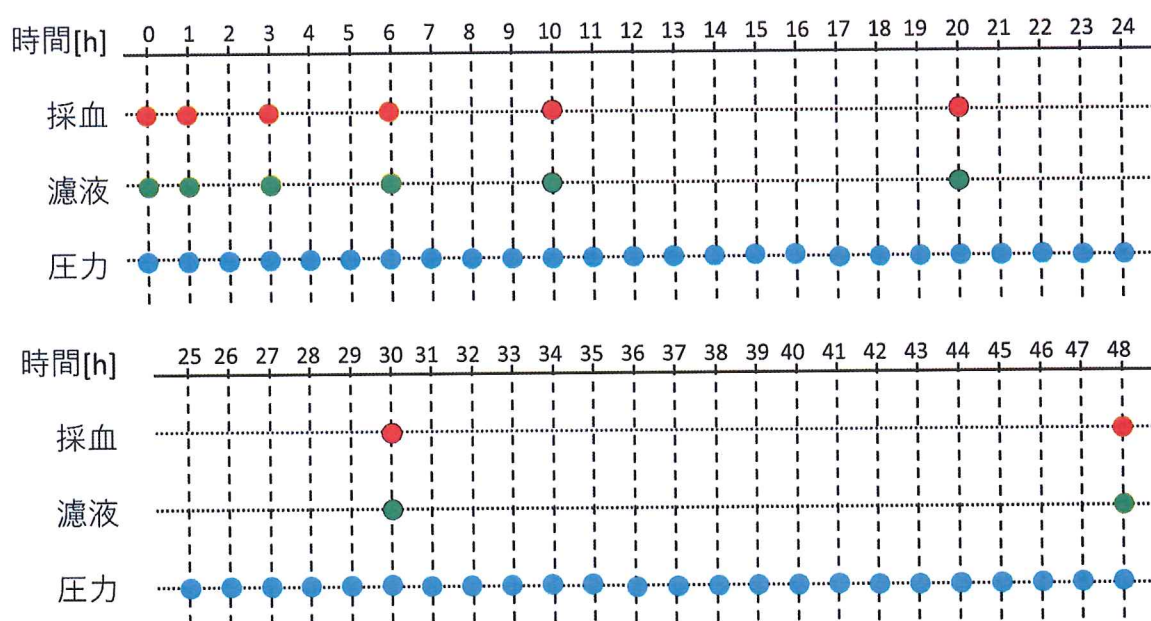


図 2-22 サンプルングポイント（中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタ実験）

2-3-8 評価項目

実験の評価は、以下の項目で行った。

- ① ヘマトクリット
- ② 血中総蛋白濃度
- ③ 濾液中に含まれる総蛋白量
- ④ PMMA 膜に吸着された総蛋白量
- ⑤ 膜間圧力差 (Transmembrane Pressure : TMP)
- ⑥ TMP の 1 時間当たりの変化 (dP/dt)
- ⑦ フィルタの入口圧と出口圧の差 (AV 差圧)
- ⑧ AV 差圧の 1 時間当たりの変化 (dP/dt)
- ⑨ TMP や AV 差圧が安定している時の比較
- ⑩ フィルタライフタイム

2-2-8 と同様の項目 (①・②・⑤・⑥・⑦・⑧・⑩) は同様の手順で実験を実施した。

③ 濾液中に含まれる総蛋白量

1. サンプルングした濾液から、マイクロ TP テストワコーを使用し、濾液中の総蛋白濃度を測定した。

マイクロ TP テストワコーの測定手順

- ① マイクロ TP テストワコーの蛋白標準液 (100 mg/dL) から検量線用のサンプルを作成した (表 2-7)。

表 2-7. マイクロ TP テストワコーの検量線溶液作成

No.	標準蛋白液	蒸留水もしくはイオン交換水	試料採取量	濃度
1	0.2 mL	0.2 mL	0.02 mL	50 mg/dL
2	原液	-	0.02 mL	100
3	原液	-	0.05 mL	247.5
4	原液	-	0.10 mL	487.1

- ② 発色試薬各 3 mL に対し、サンプルングした濾液もしくは蛋白標準液原液もしくは検量線用に希釈した溶液もしくはミリ Q を 0.05 mL 加えよく混ぜた後に 37°C にて 30 分加温した。

- ③ 発色試薬にミリ Q を混ぜた溶液をキュベットに入れ、吸光度計（主波長 600 nm、リファレンス 660 nm）の Auto Zero を測定した。
- ④ サンプリングした濾液および検量線用の溶液を混ぜた発色試薬を吸光度計にて測定した。
- ⑤ 検量線の測定結果から縦軸に吸光度、横軸に総蛋白濃度とした散布図を作成し、切片 0 にして直線近似曲線を引き、検量線とした（図 2-23）。この時、 R^2 （決定係数）表示し、 R^2 が 0.99 以上の高い相関になっていることを確認した。

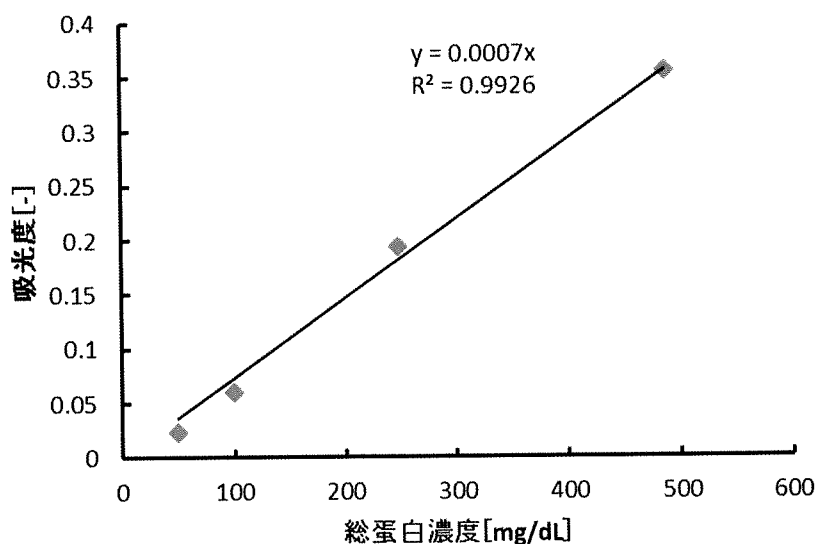


図 2-23 検量線の作成

- ⑥ 作成した近似直線式に濾液の吸光度を入れ、濾液の総蛋白濃度を測定した。

2. 求めた濾液の総蛋白濃度と濾液採取時間、濾過流量を式 2-5 に代入して、濾液中に含まれる総蛋白量を求めた。

$$V + \frac{C_{pre} + C_{post}}{2} \times t \times Q_F \cdots (2-5)$$

(V: 直前までの濾液総蛋白量、 C_{pre} : 濾液濃度測定時の濾液総蛋白濃度、 C_{post} : 直前の濾液総蛋白濃度、t: C_{pre} と C_{post} 間の時間、 Q_F : 濾過流量(今回の検討では 10 mL/min))

④ PMMA 膜に吸着された総蛋白量

血中総蛋白除去量の計算

血中総蛋白濃度、循環血液量を式 2-6 に代入して、血中総蛋白除去量を計算した。

$$V' + (C_{post'} - C_{pre'}) \times V_B \dots (2-6)$$

(V' : 直前までの血中総蛋白除去量、 $C_{pre'}$: サンプルング時の血中総蛋白濃度、 $C_{post'}$: 直前の血中総蛋白濃度、 V_B : 血液量 (今回の検討では 1 L))

血中総蛋白除去量と濾液中に含まれる総蛋白透過量の差から PMMA 膜に吸着された総蛋白量を算出した。

また、0~1 時間、1~3 時間、3~6 時間において 1 時間あたりに PMMA 膜に吸着された総蛋白量を式 2-7 より求め評価した。

$$\frac{V_F - V_{F'}}{t_F} \dots (2-7)$$

(V_F : サンプルング時の PMMA 膜に吸着された総蛋白量、 $V_{F'}$: 直前までの PMMA 膜に吸着された総蛋白量、 t_F : サンプルング間隔 (時間))

⑨ TMP や AV 差圧が安定している時の比較

すべての実験結果において圧力が上昇し始める前で安定している時間 (0~3 時間) の TMP および AV 差圧の値を 1 時間おきに記録したのを比較検討した。

2-4 統計学的解析

統計学的解析は Free J-STAT を使用し、表 2-7 の検定方法で危険率 5%未満を有意差ありとして比較検討した。

2 元配置分散分析検定においては、A 元をモデルの構築の時にはクエン酸三ナトリウム濃度、中空糸内径や膜面積の異なるフィルタの時にはフィルタの種類とし、B 元を実験経過時間として統計学的有意差を検討した。

表 2-7 統計学的解析

実験検討項目	統計学的解析
凝固・線溶系マーカ 実験モデル構築時 ・TMPが200 mmHgに達した時間とAV差圧が200 mmHgに達した時間の比較	対応のない検定
実験モデル構築時・中空糸内径や膜面積の異なるフィルタの検討の両項目共通 ・ヘマトクリット ・血中総蛋白濃度 中空糸内径や膜面積の異なるフィルタの検討 ・濾液中に含まれる総蛋白量 ・PMMA膜に吸着された総蛋白量 ・圧力が安定している時のTMPおよびAV差圧	2元配置分散分析検定
実験モデル構築時 ・フィルタのライフタイム 中空糸内径や膜面積の異なるフィルタの検討 ・血中総蛋白濃度 考察 ・中空糸膜面の蛋白濃度	Tukey検定
中空糸内径や膜面積の異なるフィルタの検討 ・フィルタのライフタイム	Friedman検定

3 結果

3-1 ブタ新鮮血液と購入血液の凝固・線溶系マーカの比較検討

新鮮血液と購入血液の凝固・線溶系マーカ（アンチトロンビンⅢ（ATⅢ）、トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体（TAT）、プラズミノノーゲンアクチベーター（Total PAI-1）、Dダイマー）を測定した。縦軸は凝固・線溶系マーカ（ATⅢ、TAT、Total PAI-1、Dダイマー）、横軸は新鮮血液もしくは購入血液を表す。また、青が新鮮血液、赤が購入血液である。実験対象群はそれぞれ新鮮血液群 n=6、購入血液群 n=12 実験を行い、箱ひげ図で表している。また、肌色で塗りつぶされている領域はヒトの基準値を示す（図 3-1）。

ATⅢは新鮮血液に比べ購入血液が有意差はないものの若干低値を示し、ばらつきも大きかった。TAT は新鮮血液に比べ購入血液が有意に高値を示し、またばらつきも大きかった。Total PAI-1 は新鮮血液に比べ購入血液が有意差はないものの若干高値を示し、ばらつきも大きかった。Dダイマーは、購入血液に比べ新鮮血液でばらつきが大きかったが、両群ともすべての測定結果においてヒトの基準値以内に入っていた。

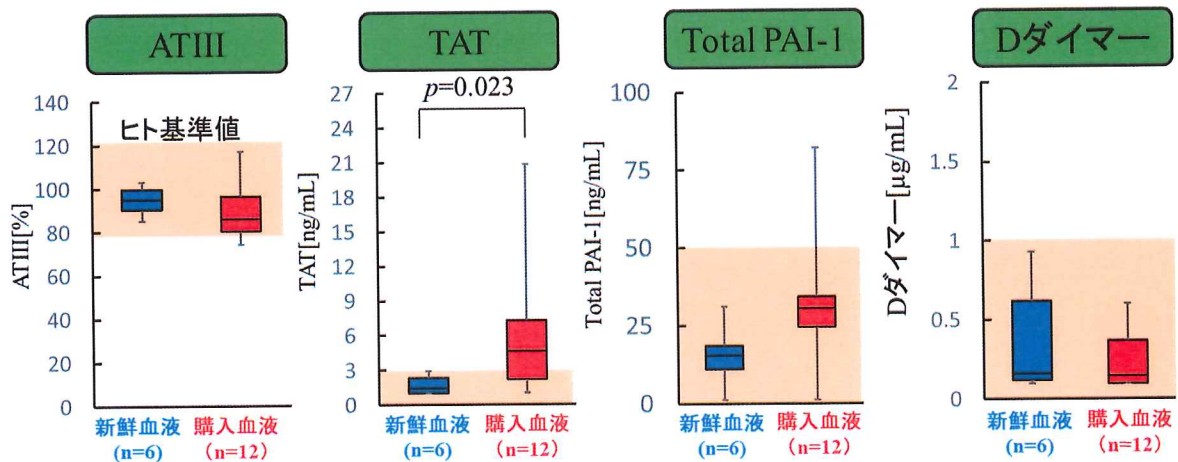


図 3-1 種凝固・線溶系マーカの比較

3-2 購入血液を使用し、CHF を模擬した長時間 ex vivo 実験モデルの構築

3-2-1 クエン酸三ナトリウム濃度の違いが、循環血液のヘマトクリットの値に与える影響

循環実験中のすべての群のクエン酸三ナトリウム濃度における循環血液のヘマトクリットを測定した。縦軸はヘマトクリット、横軸は実験経過時間を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群である。実験対照群はそれぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、平均値と標準偏差を表している (図 3-2)。循環実験中に、ヘマトクリットは、30~40%の範囲の値で軽度低下して経過した。

すべての実験において、循環実験開始時 (0h) のヘマトクリットの値がばらついているので、各群のヘマトクリット値を各群の循環実験開始時 (0h) のヘマトクリット値で正規化し、変化率として計算した (図 3-3)。循環実験中に、ヘマトクリットの変化率は、80~100%の範囲の値で徐々に低下して経過した。すべての群でヘマトクリット変化率の急激な低下はみられなかった。また、クエン酸三ナトリウムの濃度の違いにおけるヘマトクリットの変化率の経時変化に違いはみられなかった。

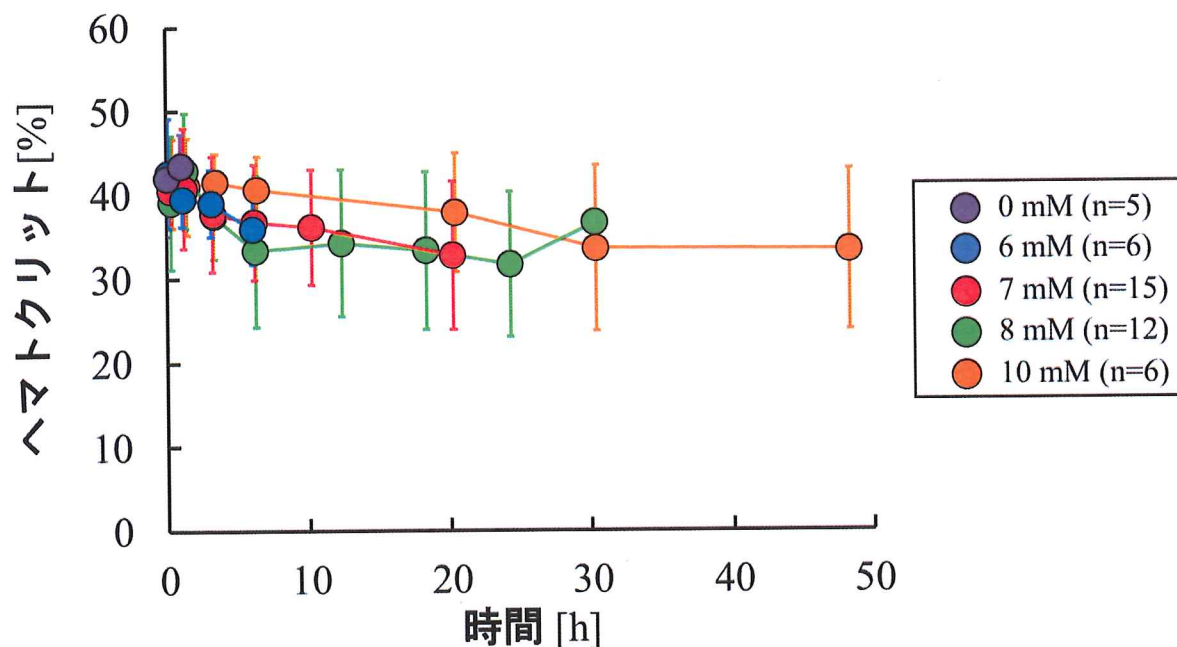


図 3-2 ヘマトクリットの経時変化

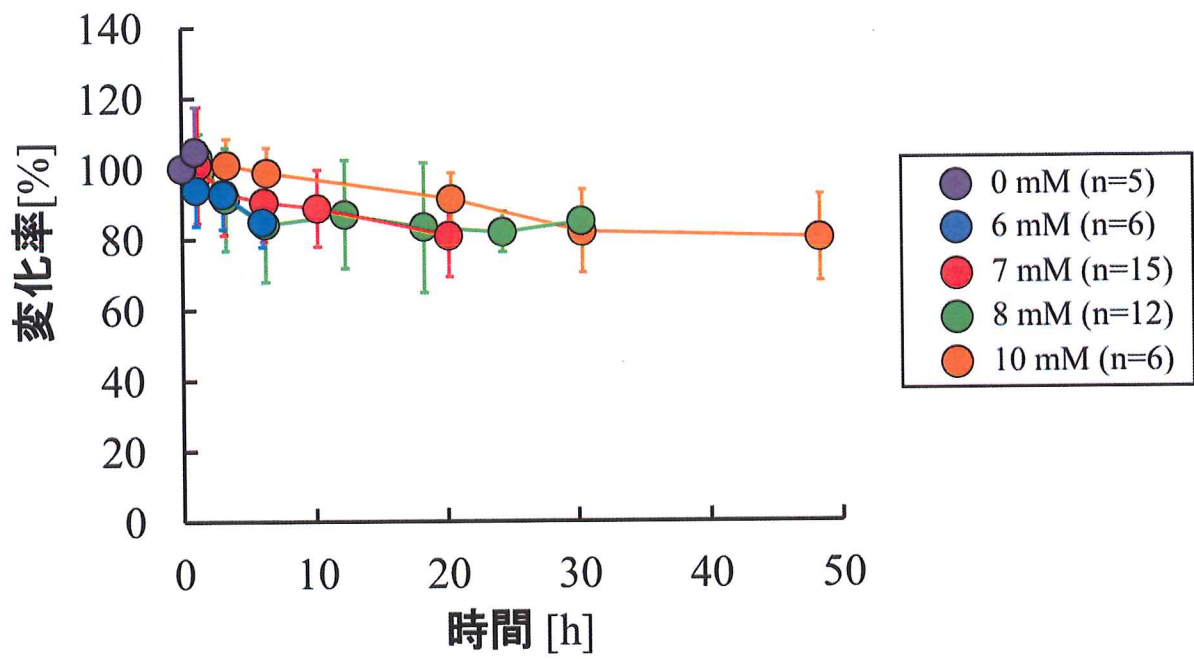


図 3-3 ヘマトクリット変化率の経時変化

3-2-2 クエン酸三ナトリウム濃度の違いが、循環血液の血中総蛋白濃度に与える影響

循環実験中のすべての群のクエン酸三ナトリウム濃度における循環血液の血中総蛋白濃度を測定した。縦軸は血中総蛋白濃度、横軸は実験経過時間を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群である。実験対象群は、0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験行い、平均値と標準偏差で示した (図 3-3)。血中総蛋白濃度は、時間経過とともに低下した。また、循環時間が長いほど低下した。

ヘマトクリットと同様に、各群のすべての血中総蛋白濃度を各群の循環実験開始時(0h)の血中総蛋白濃度で正規化し、変化率として計算した (図 3-5)。循環実験中、血中総蛋白濃度変化率は時間経過とともに低下した。また、循環時間が長いほど低下した。また、クエン酸三ナトリウム濃度の違いによる血中総蛋白濃度の変化率の経時変化に違いはみられなかった。

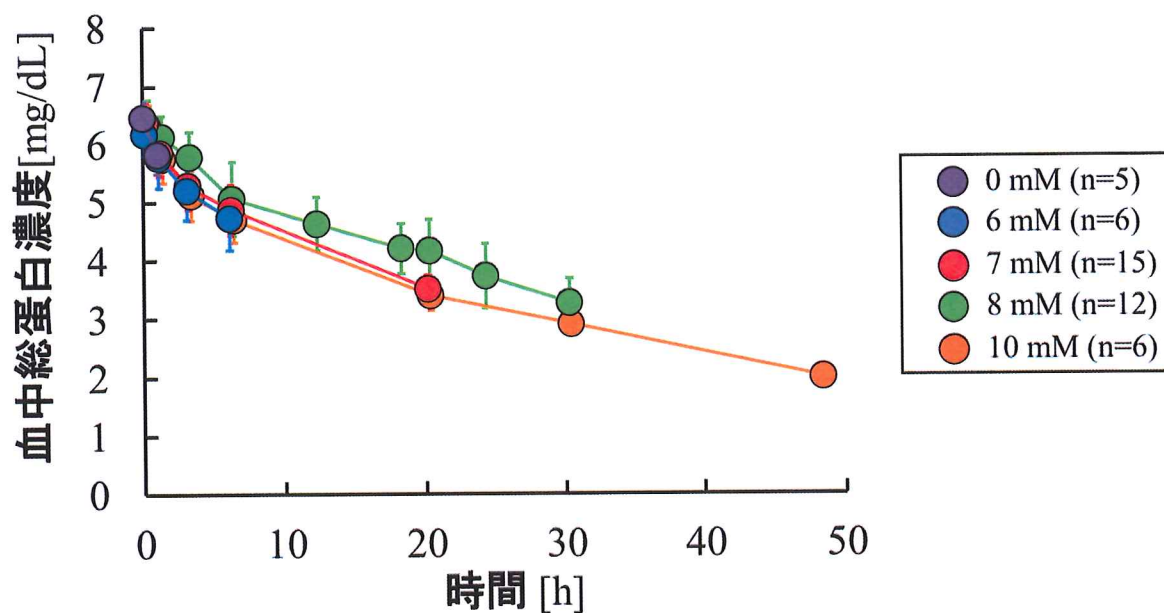


図 3-4 血中総蛋白濃度の経時変化

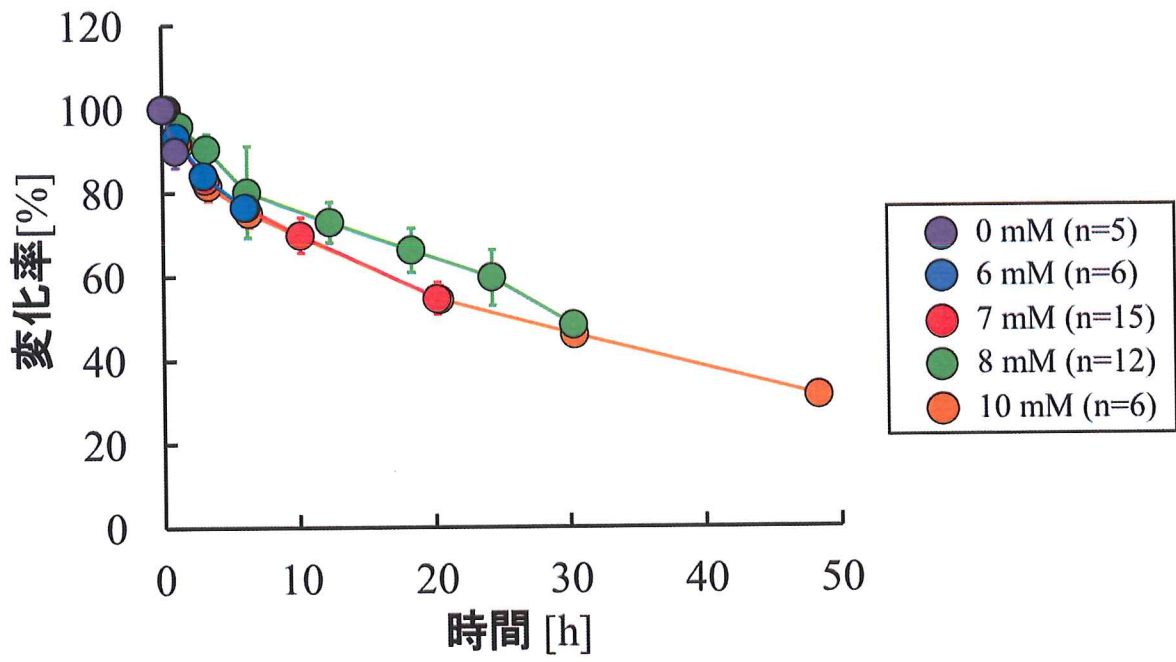


図 3-5 血中総蛋白濃度の変化率の経時変化

3-2-3 クエン酸三ナトリウム濃度の違いがフィルタの TMP に与える影響

循環実験中の入口圧、返血圧、ろ過圧を測定し、測定した3種類の圧力から TMP を式 2-2 より算出した。縦軸は TMP、横軸は実験経過時間を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群の結果である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、各線が各実験結果を表している (図 3-6)。

TMP は循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後すべての実験で上昇もしくは上昇傾向を示した。

クエン酸三ナトリウム濃度が高くなると、TMP が上昇するまでの時間が長くなった。特に 10 mM 群では、48 時間経過しても膜の細孔が目詰まりした時間として評価する TMP が 200 mmHg まで上昇しないことが 6 回中 3 回あった。8 mM においても TMP が 200 mmHg まで上昇しないことが 12 回中 1 回あった。一方、0 mM 群や 6 mM 群では、実験がほぼ 10 時間以内で終了した。また、TMP が 200 mmHg まで達しないで、血液回路や血液バッグの凝固により実験が終了する結果も、0 mM 群では 5 回中 4 回、6 mM 群では 6 回中 2 回あった。

クエン酸三ナトリウム濃度が低くなると圧力が急上昇し、クエン酸三ナトリウム濃度が圧力の上昇が比較的緩やかであった。

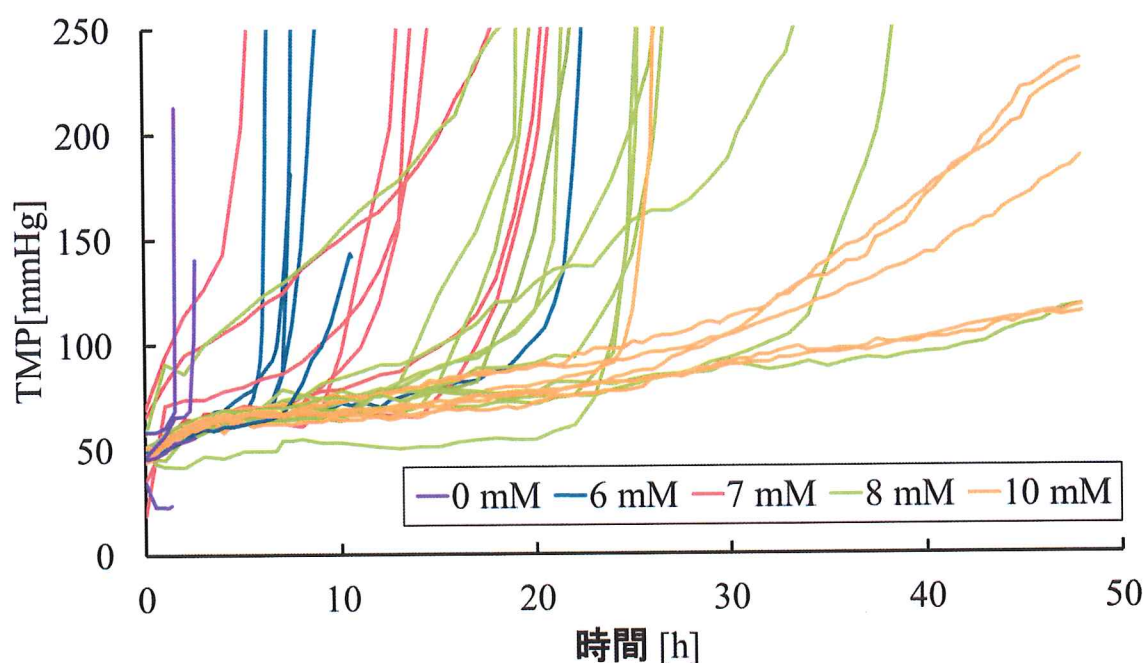


図 3-6 TMP の経時変化

3-2-4 循環実験中のフィルタの TMP が 200 mmHg に達した時間の比較

循環実験中の TMP の経時変化から、各群のクエン酸三ナトリウム濃度における TMP が 200 mmHg に達した時間を計算した。縦軸は TMP が 200 mmHg に達した時間、横軸は各クエン酸三ナトリウムの濃度を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム濃度 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、平均値と標準偏差を表している (図 3-7)。

クエン酸三ナトリウム濃度 10 mM 群の TMP が 200 mmHg に達するまでの時間は、ほかの 4 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 8 mM 群の TMP が 200 mmHg に達するまでの時間は、ほかの 0 mM 群、6 mM 群、7 mM 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 7 mM 群の TMP が 200 mmHg に達するまでの時間は、0 mM 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 7 mM 群の TMP が 200 mmHg に達するまでの時間は、6 mM 群と有意な差はなかった。クエン酸三ナトリウム濃度 6 mM 群の TMP が 200 mmHg に達するまでの時間は、0 mM 群と有意な差はなかった。TMP が 200 mmHg に達するまでの時間は、クエン酸三ナトリウム濃度が高くなればなるほど延長した。

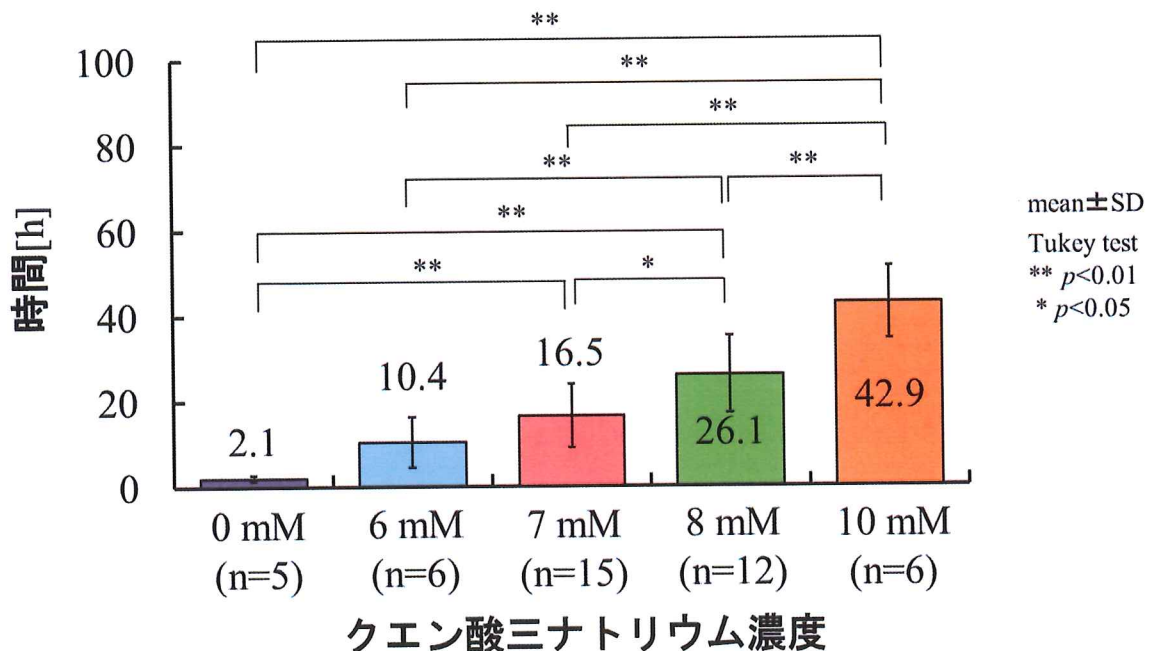


図 3-7 TMP が 200 mmHg に達した時間

3-2-5 クエン酸三ナトリウム濃度の違いが、フィルタの TMP の dP/dt に与える影響

循環実験中において、算出した TMP から、1 時間当たりの変化 (dP/dt) を算出した。縦軸は TMP の dP/dt、横軸は実験経過時間を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、各線が各実験結果を表している (図 3-8)。

クエン酸三ナトリウム 0 mM、6 mM、7 mM、8 mM 群の TMP の dP/dt は循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇した。クエン酸三ナトリウム 10 mM 群の TMP の dP/dt は循環開始からほとんど変化しなかった。

クエン酸三ナトリウム濃度が高くなればなるほど、TMP の dP/dt が上昇するまでの時間が長くなった。特にクエン酸三ナトリウム濃度 10 mM 群では、循環時間が 48 時間経過しても膜の細孔が目詰まりし始めた時間として評価した TMP の dP/dt が 15 mmHg/h まで上昇しない結果が 6 回中 3 回あった。また、8 mM においても循環時間が 48 時間経過しても TMP の dP/dt が 15 mmHg/h まで上昇しない結果が 12 回中 1 回あった。一方、0 mM 群では、TMP の dP/dt が 15 mmHg/h まで上昇しないで、血液回路や血液バッグの凝固により実験が終了する結果が 5 回中 3 回あった。

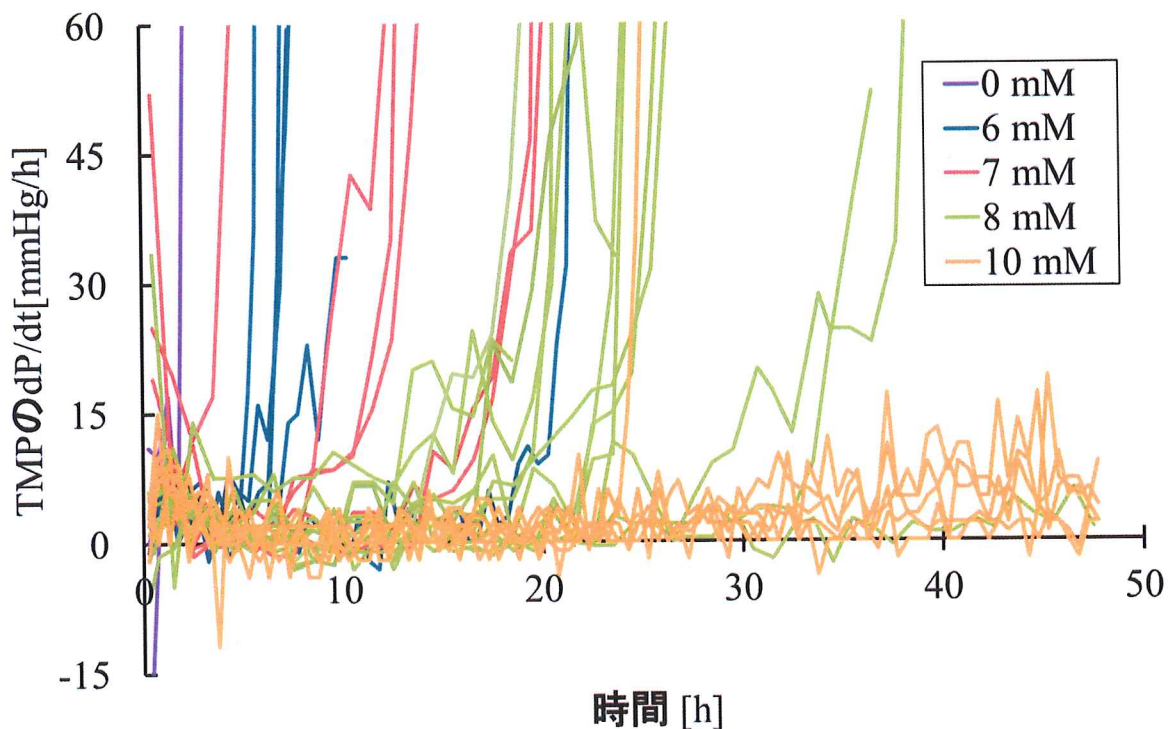


図 3-8 TMP の dP/dt の経時変化

3-2-6 循環実験中のフィルタのTMPのdP/dtが15 mmHg/h以上に上昇した時間の比較

循環実験中のTMPのdP/dtの経時変化から、各クエン酸三ナトリウム濃度におけるTMPが15 mmHg/h以上上昇した時間を求めた。縦軸はTMPが15 mmHg/h以上上昇した時間、横軸は各クエン酸三ナトリウムの濃度を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム濃度0 mM群、青が6 mM群、赤が7 mM群、緑が8 mM群、オレンジが10 mMである。群実験対照群それぞれ0 mM群 n=5、6 mM群 n=6、7 mM群 n=15、8 mM群 n=12、10 mM群 n=6 実験を行い、平均値と標準偏差を表している（図3-9）。

クエン酸三ナトリウム濃度10 mM群では、TMPのdP/dtが15 mmHg/h以上に上昇した時間は、ほかの4群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度8 mM群のTMPのdP/dtが15 mmHg/h以上に上昇した時間は、ほかの0 mM群、6 mM群、7 mM群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度7 mM群のTMPのdP/dtが15 mmHg/h以上に上昇した時間は、0 mM群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度7 mM群のTMPのdP/dtが15 mmHg/h以上に上昇した時間は、6 mM群有意な差はなかった。クエン酸三ナトリウム濃度6 mM群のTMPのdP/dtが15 mmHg/hに達するまでの時間は、0 mM群と有意な差はなかった。

TMPが15 mmHg/h以上に上昇した時間もTMPが200 mmHgに達した時間と同様に、クエン酸三ナトリウム濃度が高いほど延長した。

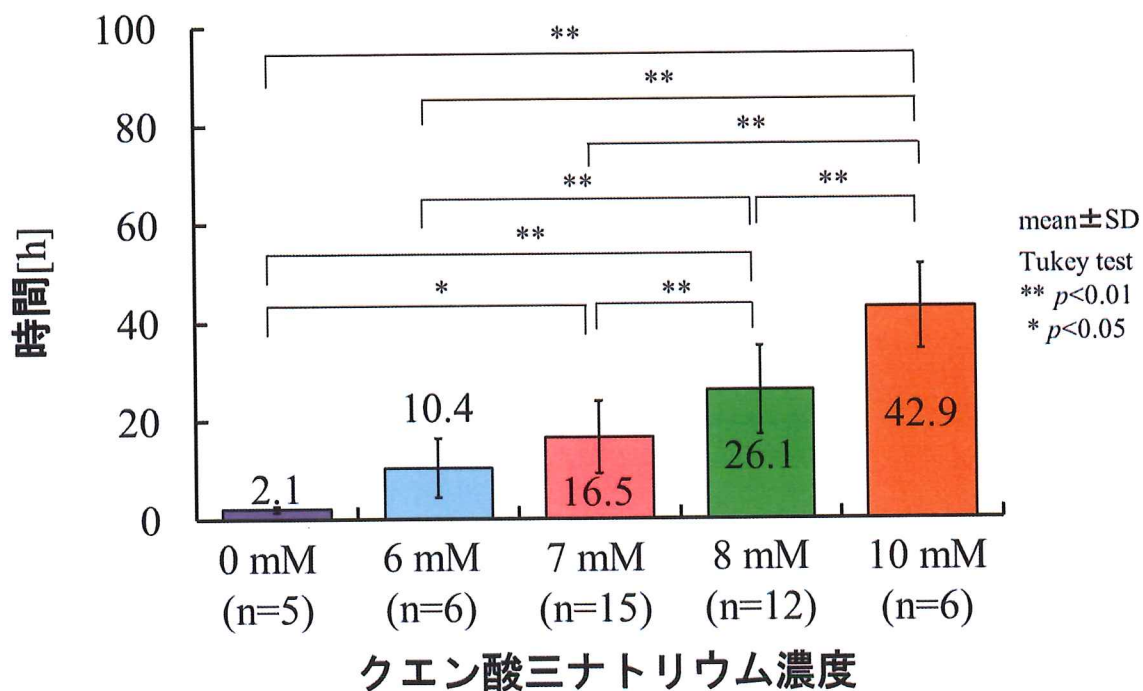


図3-9 TMPのdP/dtが15mmHg/h以上に上昇した時間

3-2-7 クエン酸三ナトリウム濃度の違いが、フィルタの AV 差圧に与える影響

循環実験中の入口圧と返血圧の差 (AV 差圧) を式 2-3 より算出した。縦軸は AV 差圧、横軸は実験経過時間を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群の結果である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、各線が各実験結果を表している (図 3-10)。

AV 差圧は循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇もしくは上昇傾向を示した。

クエン酸三ナトリウム濃度が高くなればなるほど、AV 差圧が上昇するまでの時間が長くなった。特にクエン酸三ナトリウム濃度 10 mM 群では、循環時間 48 時間経過しても中空糸自体が詰まった時間として評価した AV 差圧が 200 mmHg まで達しなかったのは 6 回中 5 回もあった。一方、0 mM 群や 6 mM 群では、AV 差圧が 200 mmHg まで達しないで、血液回路や血液バッグの凝固で実験が終了する結果も 0 mM 群で 5 回中 3 回、6 mM 群で 6 回中 4 回あった。また、AV 差圧が 200 mmHg まで達しないで、TMP が 400 mmHg に達し実験が終了した結果は、6 mM で 6 回中 1 回、7 mM で 15 回中 1 回、8 mM で 12 回 2 回あった。

クエン酸三ナトリウム濃度が低くなると圧力が急上昇し、クエン酸三ナトリウム濃度が圧力の上昇が比較的緩やかであった。

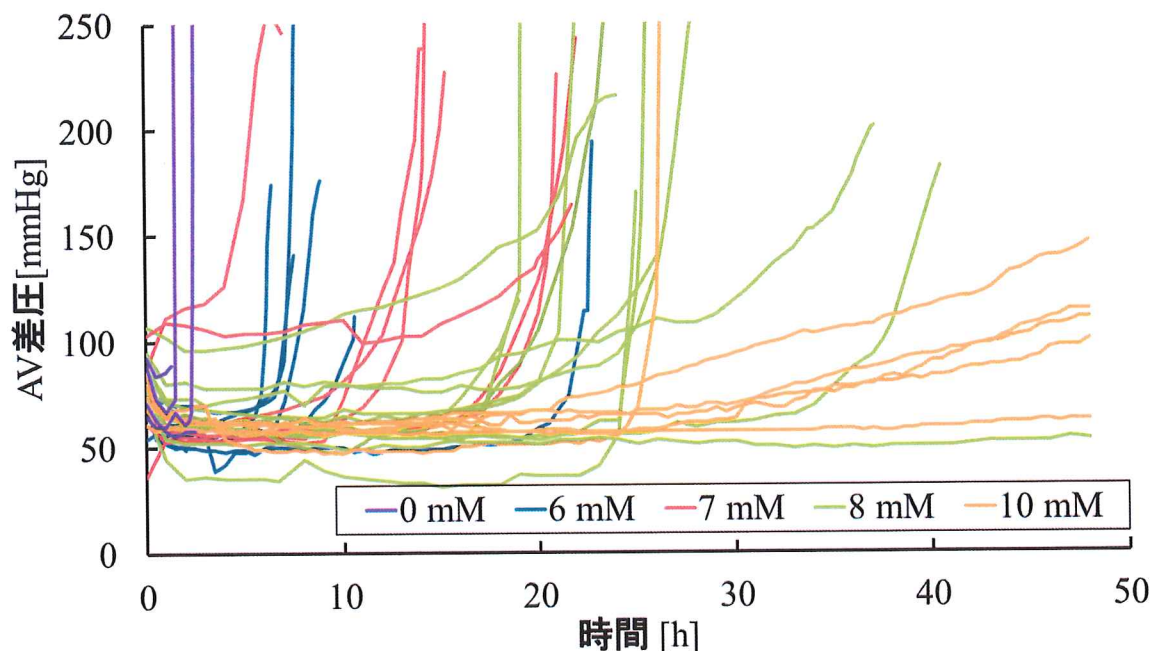


図 3-10 AV 差圧の経時変化

3-2-8 循環実験中のフィルタの AV 差圧が 200 mmHg に達した時間の比較

循環実験中の AV 差圧の経時変化から、各クエン酸三ナトリウム濃度における AV 差圧が 200 mmHg に達した時間を計算した。縦軸は AV 差圧が 200 mmHg に達した時間、横軸は各クエン酸三ナトリウムの濃度を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム濃度 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、平均値と標準偏差を表している (図 3-11)。

クエン酸三ナトリウム濃度 10 mM 群の AV 差圧が 200 mmHg に達するまでの時間は、ほかの 4 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 8 mM 群の AV 差圧が 200 mmHg に達するまでの時間は、ほかの 0 mM 群、6 mM 群、7 mM 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 7 mM 群の AV 差圧が 200 mmHg に達するまでの時間は、0 mM 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 7 mM 群の AV 差圧が 200 mmHg に達するまでの時間は、6 mM 群と有意な差はなかった。クエン酸三ナトリウム濃度 6 mM 群の TMP の dP/dt が 15 mmHg/h に達するまでの時間は、0 mM 群と有意な差はなかった。AV 差圧が 200 mmHg に達するまでの時間は、クエン酸三ナトリウム濃度が高くなればなるほど延長した。

AV 差圧が 200 mmHg に達するまでの時間は、TMP が 200 mmHg に達するまでの時間と同様に、クエン酸三ナトリウム濃度が高くなればなるほど延長した。

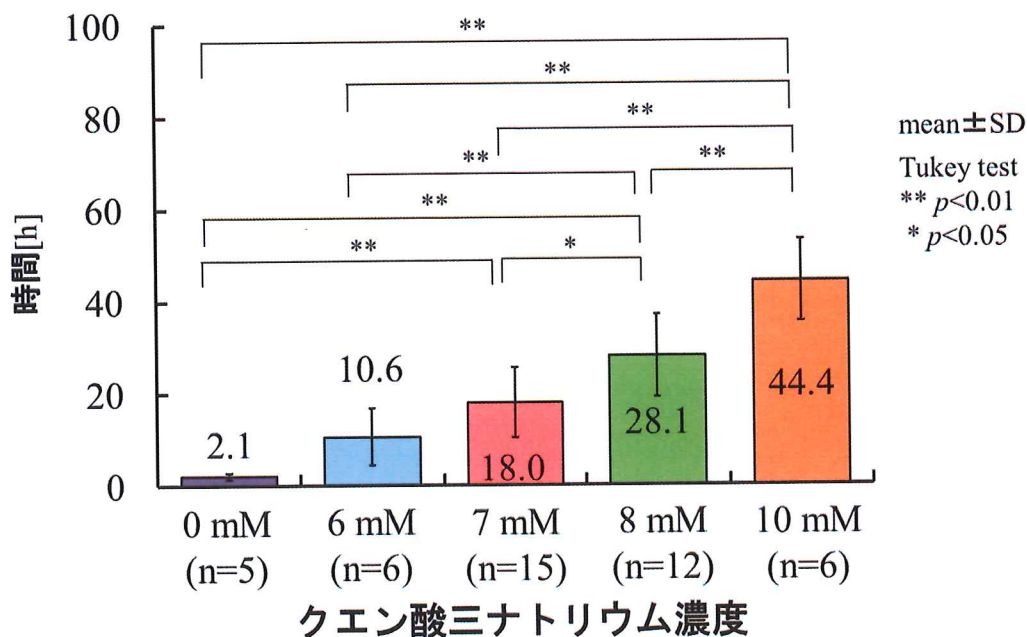


図 3-11 AV 差圧が 200 mmHg に達した時間

3-2-9 クエン酸三ナトリウム濃度の違いが、フィルタの AV 差圧の dP/dt に与える影響

循環実験中において、算出した AV 差圧から、1 時間当たりの変化 (dP/dt) を算出した。縦軸は AV 差圧の dP/dt、横軸は実験経過時間を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、各線が各実験結果を表している (図 3-12)。

AV 差圧の dP/dt は循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇した。

クエン酸三ナトリウム 0 mM、6 mM、7 mM、8 mM 群の AV 差圧の dP/dt は循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇した。クエン酸三ナトリウム 10 mM 群の AV 差圧の dP/dt は循環開始からほとんど変化しなかった。

クエン酸三ナトリウム濃度が高くなればなるほど、AV 差圧の dP/dt が上昇するまでの時間が長くなった。特にクエン酸三ナトリウム濃度 10 mM 群では、循環時間が 48 時間経過しても中空糸自体が詰まり始めた時間として評価した AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h まで上昇しない結果が 6 回中 5 回あった。一方、AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h まで達しないで、血液回路や血液バッグの凝固により実験が終了する結果も 0 mM で 5 回中 4 回あった。また、AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h 以上上昇しないで、TMP が 400 mmHg に達し実験が終了した結果は、7 mM で 15 回中 1 回、8 mM で 12 回中 1 回あった。

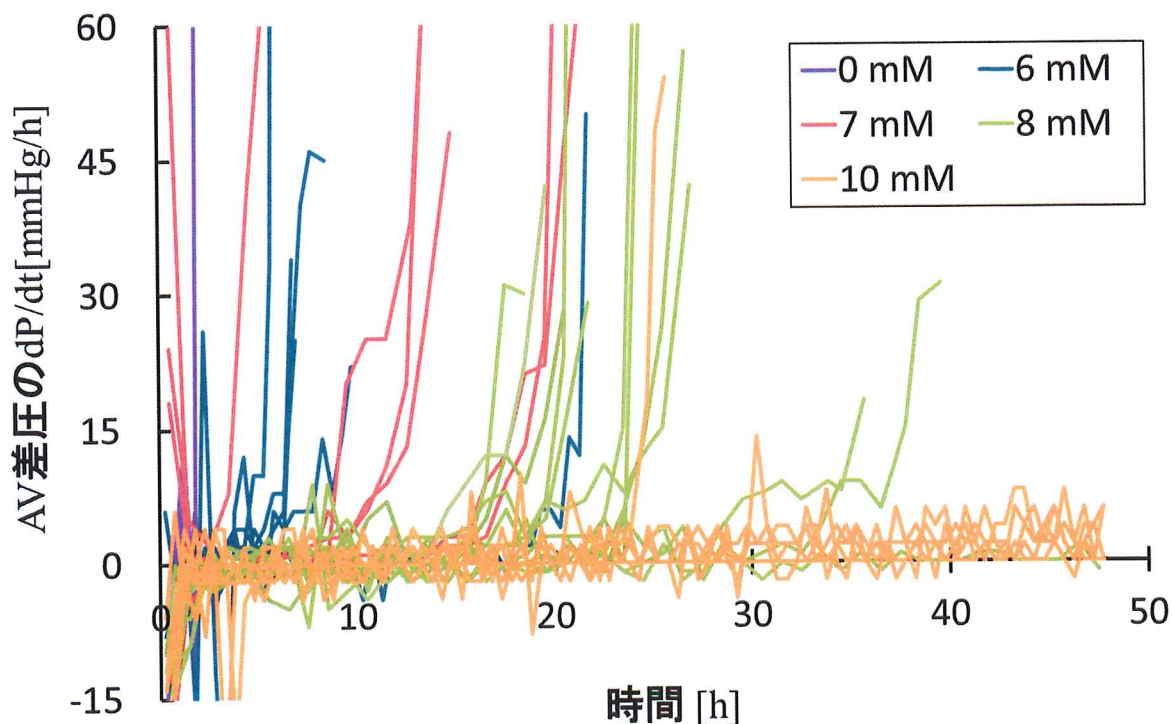


図 3-12 AV 差圧の dP/dt の経時変化

3-2-10 循環実験中のフィルタの AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h 以上に上昇した時間の比較

循環実験中の AV 差圧の dP/dt の経時変化から、AV 差圧が 15 mmHg/h 以上上昇した時間を求めた。縦軸は AV 差圧が 15 mmHg/h 以上上昇した時間、横軸は各クエン酸三ナトリウムの濃度を表す。また、紫がクエン酸三ナトリウム濃度 0 mM 群、青が 6 mM 群、赤が 7 mM 群、緑が 8 mM 群、オレンジが 10 mM 群である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、平均値と標準偏差を表している）として評価した（図 3-13）。

クエン酸三ナトリウム濃度 10 mM 群では、AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h 以上に上昇した時間は、ほかの 4 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 8 mM 群の AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h 以上に上昇した時間は、ほかの 0 mM 群、6 mM 群、7 mM 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 7 mM 群の AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h 以上に上昇した時間は、0 mM 群に比べて、有意に長かった。クエン酸三ナトリウム濃度 7 mM 群の AV 差圧の dP/dt が 15 mmHg/h 以上に上昇した時間は、6 mM 群と有意な差はなかった。クエン酸三ナトリウム濃度 6 mM 群の TMP の dP/dt が 15 mmHg/h に達するまでの時間は、0 mM 群と有意な差はなかった。

AV 差圧が 15 mmHg/h 以上上昇した時間も AV 差圧が 200 mmHg に達した時間と同様に、クエン酸三ナトリウム濃度が高いほど延長した。

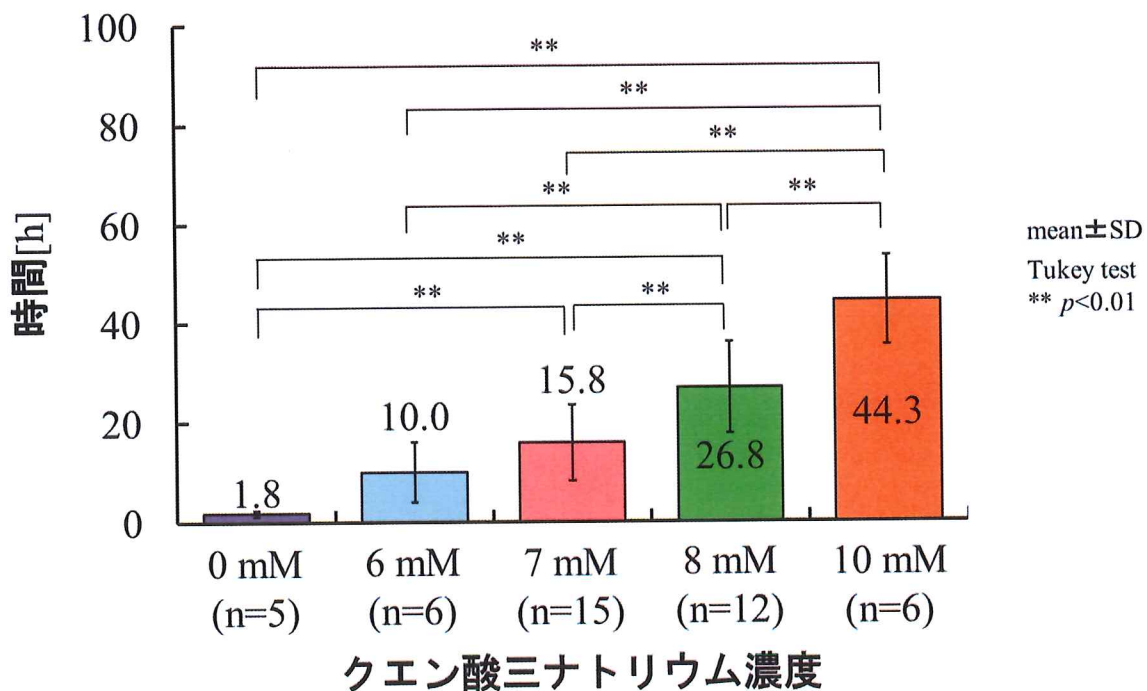


図 3-13 AV 差圧の dP/dt が 15mmHg/h 以上上昇した時間

3-2-11 TMP が 200 mmHg に達した時間と AV 差圧が 200 mmHg に達した時間の比較

循環実験中の各クエン酸三ナトリウム濃度における TMP が 200 mmHg に達した時間と AV 差圧が 200 mmHg に達した時間を比較した。縦軸は TMP もしくは AV 差圧が 200 mmHg に達した時間、横軸は各クエン酸三ナトリウム濃度を表す。また、黄色は TMP が 200 mmHg に達した時間群、灰色は AV 差圧が 200 mmHg に達した時間群である。実験対照群それぞれ 0 mM 群 n=5、6 mM 群 n=6、7 mM 群 n=15、8 mM 群 n=12、10 mM 群 n=6 実験を行い、平均値と標準偏差を表している (図 3-14)。

クエン酸三ナトリウム濃度 0 mM 群、6 mM 群、10 mM 群の時は、TMP が 200 mmHg に達した時間と AV 差圧が 200 mmHg に達した時間に有意な差はみられなかった。

クエン酸三ナトリウム濃度が 7 mM 群、8 mM 群の時は、TMP が 200 mmHg に達した時間は AV 差圧が 200 mmHg に達した時間に比べ有意に低値を示した。

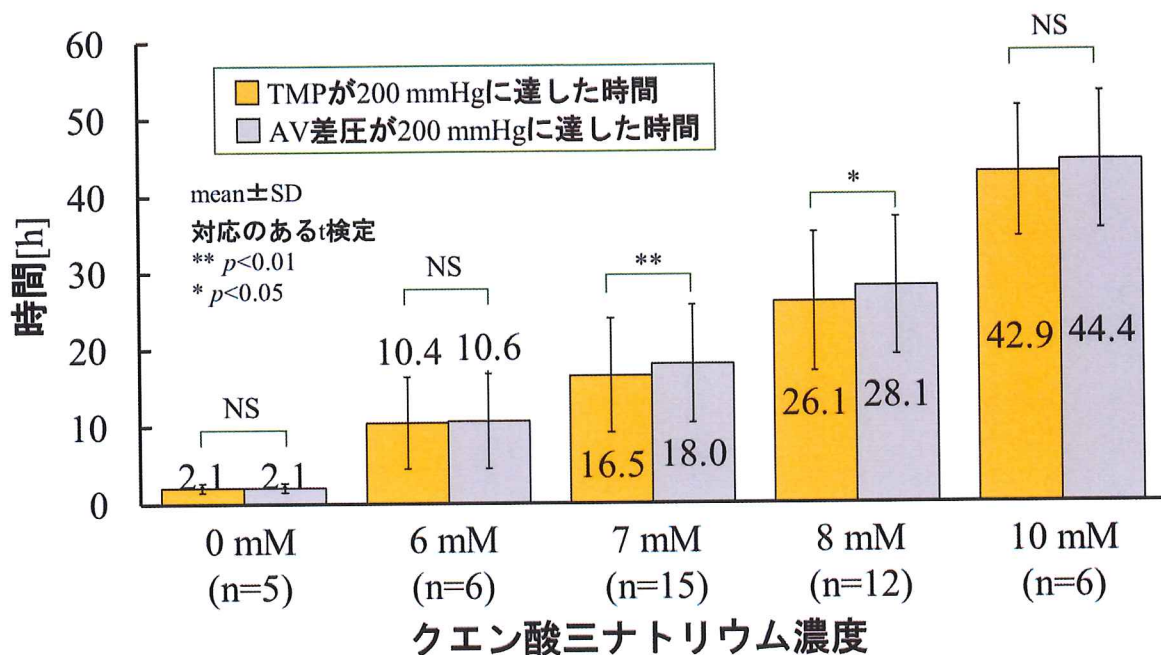


図 3-14 TMP が 200 mmHg に達した時間と AV 差圧が 200 mmHg に達した時間の比較

3-3 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのライフタイムや蛋白除去性能の検討

3-3-1 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタがヘマトクリットに与える影響

循環実験中の各フィルタにおける循環血液のヘマトクリットを測定した。縦軸はヘマトクリット、横軸は実験経過時間を表す。青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群で、各群、同様の実験を15回行い、実験開始から0~6時間までのヘマトクリットの平均と標準偏差を表している(図3-15)。最も早く実験が終了した条件は、CH-1.0Nで6時間36分であったため、すべてのデータがそろっている循環実験開始から6時間までのデータで評価した。

循環実験中、どのフィルタでもヘマトクリットは時間経過で変化なかった。また、各フィルタ間のヘマトクリットに有意な差はみられなかった。

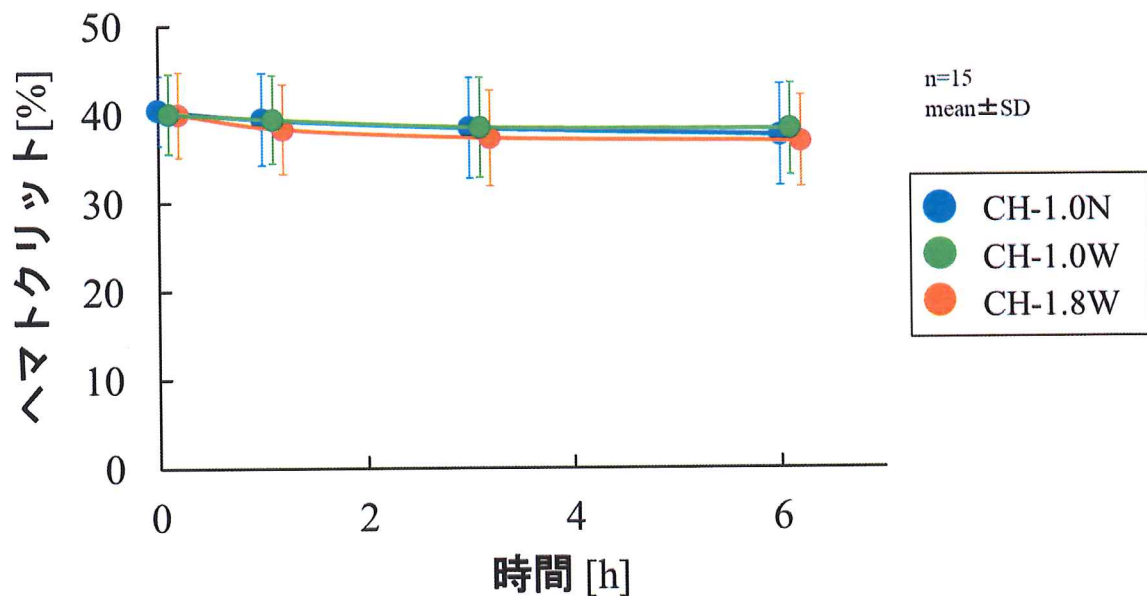


図 3-15 3種類のフィルタのヘマトクリットの経時変化

3-3-2 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタが血中総蛋白濃度に与える影響

循環実験中の各フィルタにおける循環血液の血中総蛋白濃度を測定した。縦軸は血中総蛋白濃度、横軸は各群別の実験経過時間を表す。青が CH-1.0N 群、緑が CH-1.0W 群、オレンジが CH-1.8W 群で、各群、同様の実験を 15 回行い、実験開始から 0~6 時間までのヘマトクリットの平均と標準偏差を表している (図 3-16~19)。最も早く実験が終了した条件は、CH-1.0N で 6 時間 36 分であったため、すべてのデータがそろっている循環実験開始から 6 時間までのデータで評価した。

すべての群のフィルタで、循環実験中、血中総蛋白濃度は時間経過とともに低下した。

CH-1.0N は、実験開始前 (前) に比べ、1、3、6 時間で有意に低値を示した。0 時間に比べ、1、3、6 時間で有意に低値を示した。1 時間に比べ、3、6 時間で有意に低値を示した。3 時間に比べ、6 時間で有意に低値を示した。

CH-1.0W と CH-1.8W は、前に比べ、0、1、3、6 時間で有意に低値を示した。0 時間に比べ、1、3、6 時間で有意に低値を示した。1 時間に比べ、3、6 時間で有意に低値を示した。3 時間に比べ、6 時間で有意に低値を示した。

また、中空糸内径が太い CH-1.0W 群と CH-1.8W 群の血中総蛋白濃度は中空糸内径が細い CH-1.0N 群に比べ有意に低値を示した。

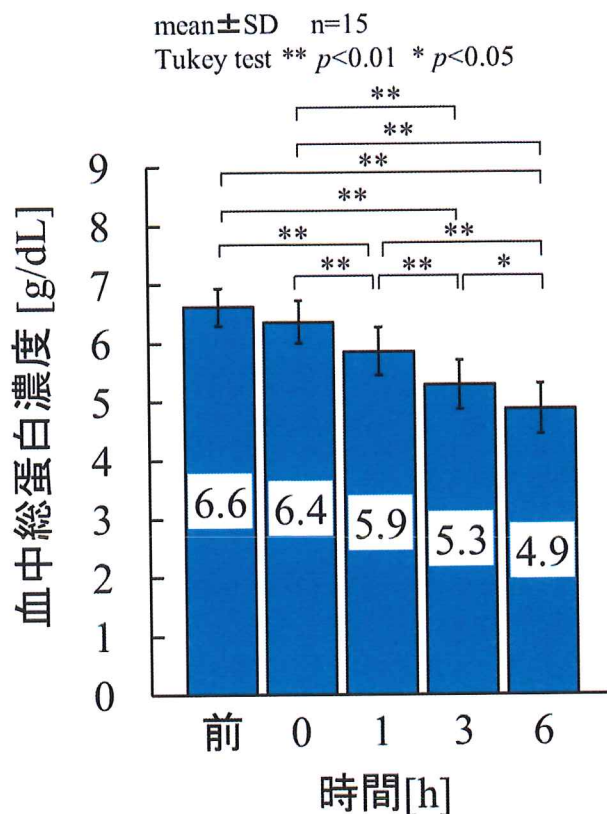


図 3-16 CH-1.0N 血中総蛋白濃度の経時変化

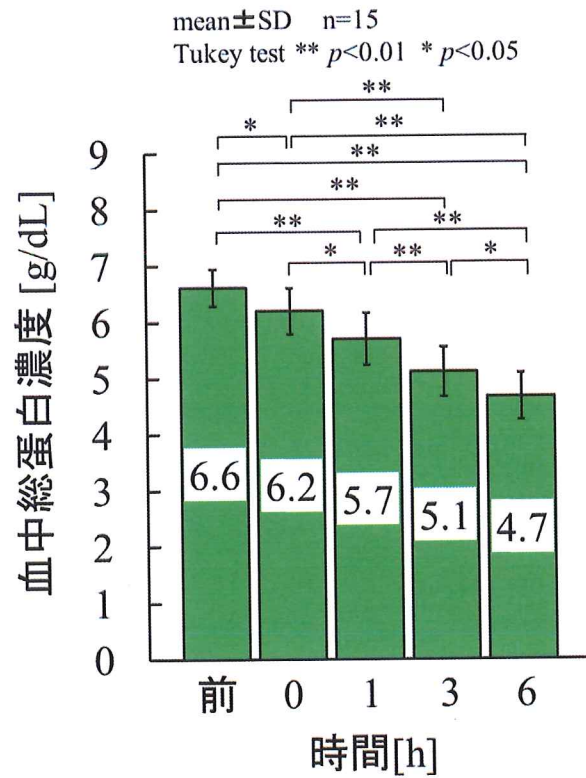


図 3-17 CH-1.0W 血中総蛋白濃度の経時変化

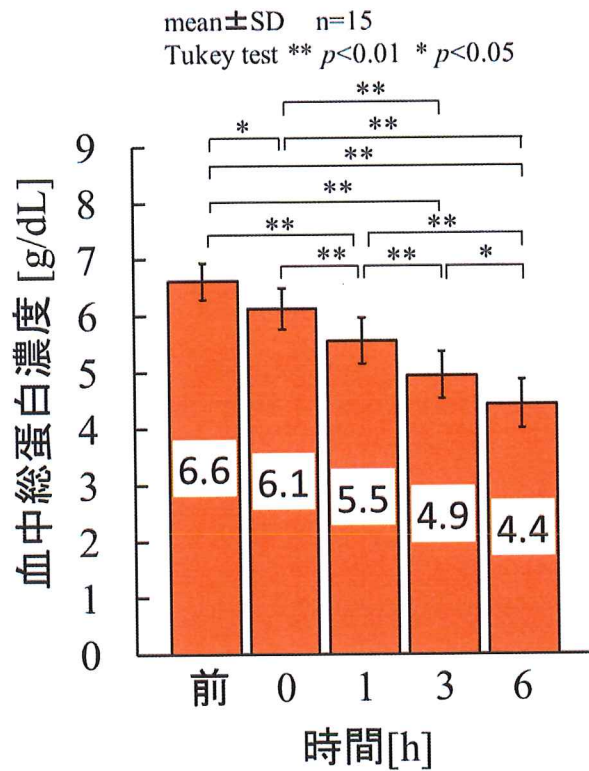


図 3-18 CH-1.8W 血中総蛋白濃度の経時変化

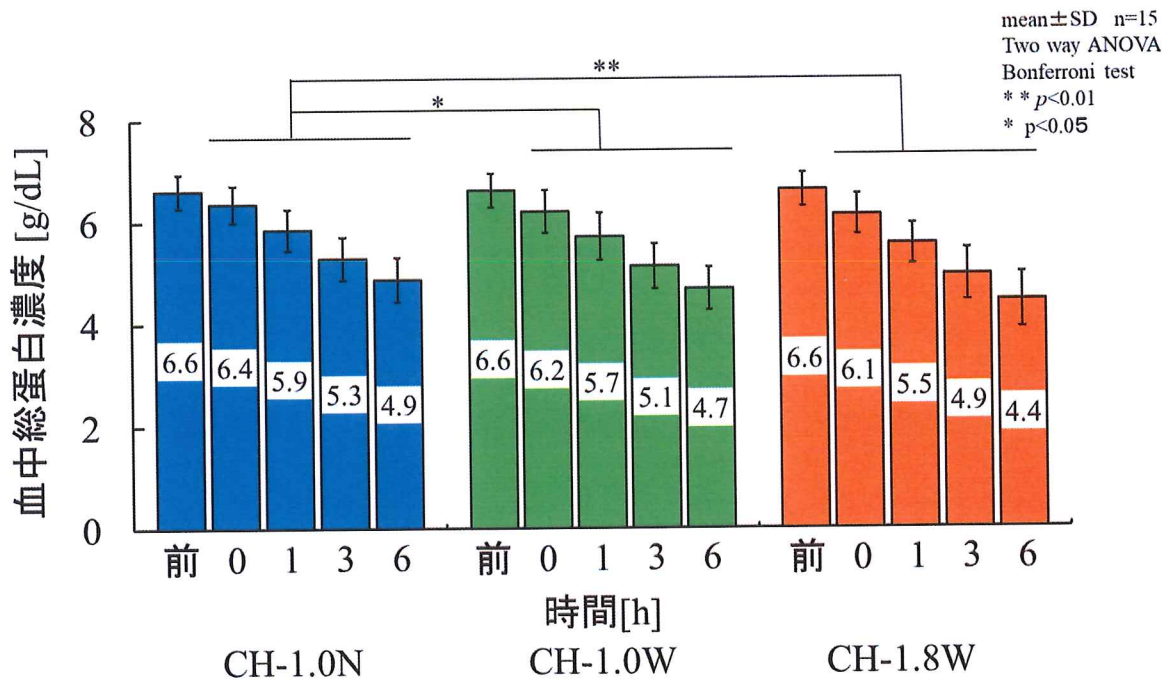


図 3-19 3 種類のフィルタの血中総蛋白濃度の変化

3-3-3 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタが濾液中に含まれる総蛋白量に与える影響

循環実験中の各フィルタにおける濾液中に含まれる総蛋白濃度を測定し、濾液中に含まれる濾液総蛋白量を計算した(式2-5)。縦軸は濾液中に含まれる総蛋白量、横軸は各群別の実験経過時間を表す。青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群で、各群、同様の実験を15回行い、循環実験開始(0)から1時間まで貯留した濾液中の総蛋白漏出量、0から3時間まで貯留した濾液中の総蛋白漏出量、0から6時間まで貯留した濾液中の総蛋白漏出量の平均と標準偏差を表している(図3-20)。最も早く実験が終了した条件は、CH-1.0Nで6時間36分であったため、今回の検討ではすべてのデータがそろっている循環実験開始から6時間経過後までのデータを評価した。

すべての群のフィルタで、0から1時間まで貯留した濾液に含まれる総蛋白量は少量だったが、時間経過とともに貯留した濾液に含まれる総蛋白量は増加した。濾液総蛋白量は、3種類のフィルタ間で有意な差はみられなかった。

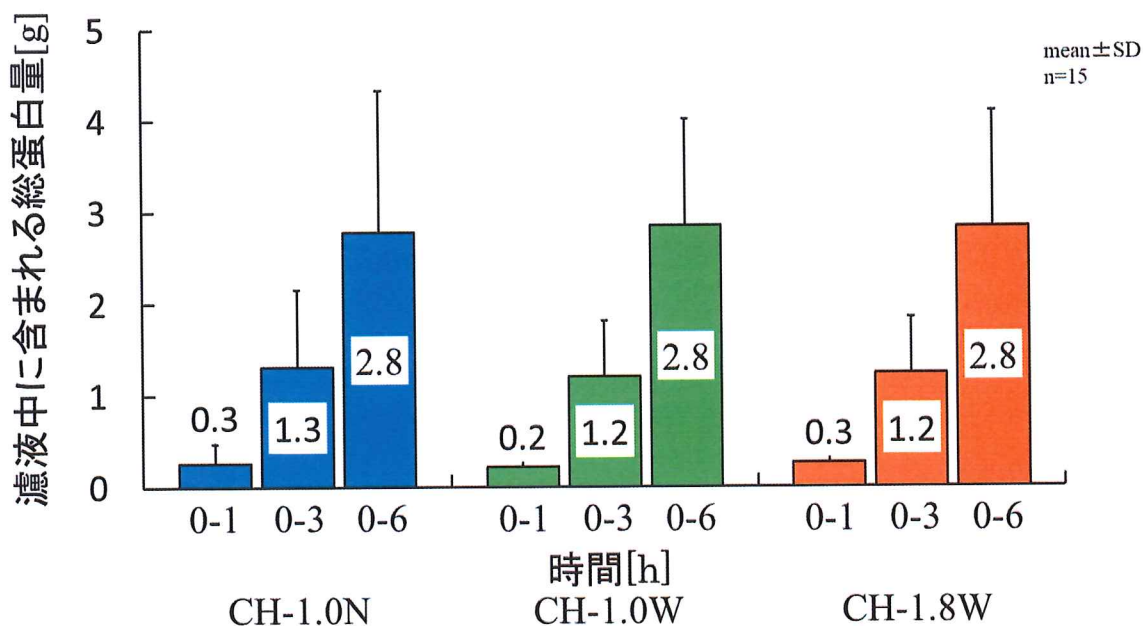


図3-20 3種類のフィルタの濾液総蛋白量の変化

3-3-4 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタの総蛋白吸着量の違い

循環実験中の各フィルタにおけるPMMA膜に吸着された総蛋白量を血中総蛋白濃度から求めた血中蛋白除去量(式2-6)と濾液総蛋白量の差から計算した。縦軸はPMMA膜に吸着された総蛋白量、横軸は各群別の実験経過時間を表す。青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群で、各群、同様の実験を15回行い、循環実験開始(0)から1時間にPMMA膜に吸着された総蛋白量、0から3時間にPMMA膜に吸着された総蛋白量、0から6時間にPMMA膜に吸着された総蛋白量の平均と標準偏差を表している(図3-21)。最も早く実験が終了した条件は、CH-1.0Nで6時間36分であったため、今回の検討ではすべてのデータがそろっている循環実験開始から6時間経過後はまでのデータを評価した。

PMMA膜に吸着された総蛋白量は、中空糸内径が太いCH-1.0WとCH-1.8Wが中空糸内径が細いCH-1.0Nに比べ有意に高値を示した。

1時間あたりにPMMA膜に吸着された総蛋白量を式2-7より計算した(図3-22)。各フィルタ間に有意な差はみられなかった。PMMA膜に吸着される総蛋白量は、治療開始時から0~1時間目までが最も多く、1~3時間までは0~1時間の約半分になり、3~6時間では1~3時間の1/3程度まで低下した。

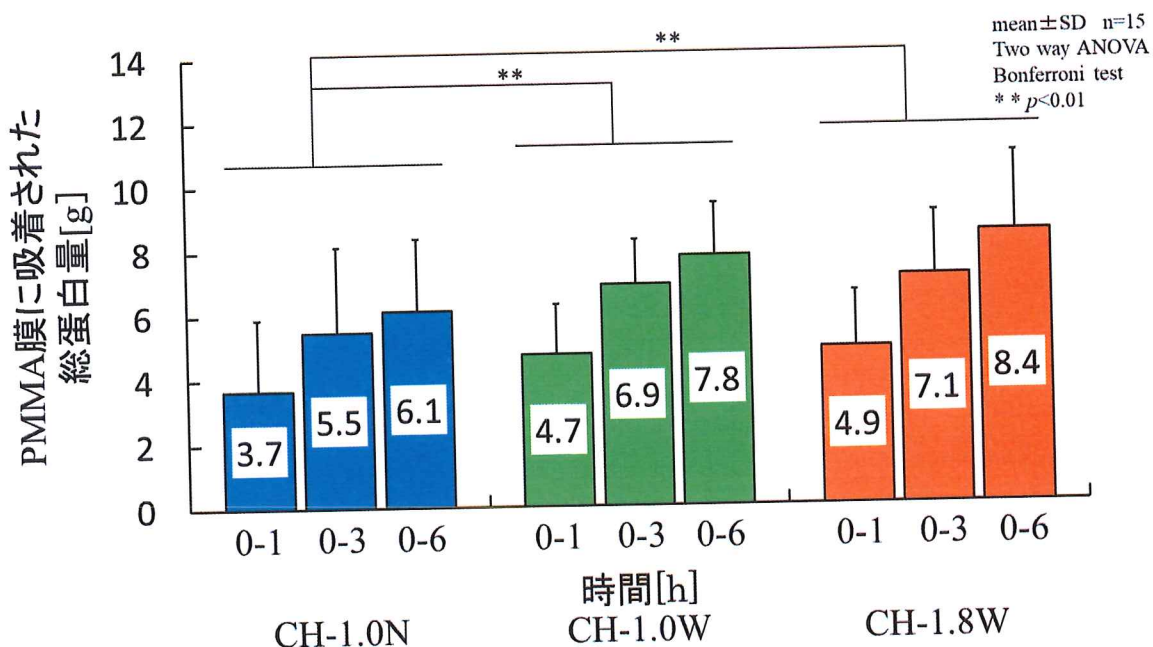


図3-21 3種類のフィルタのPMMA膜に吸着された総蛋白量の変化

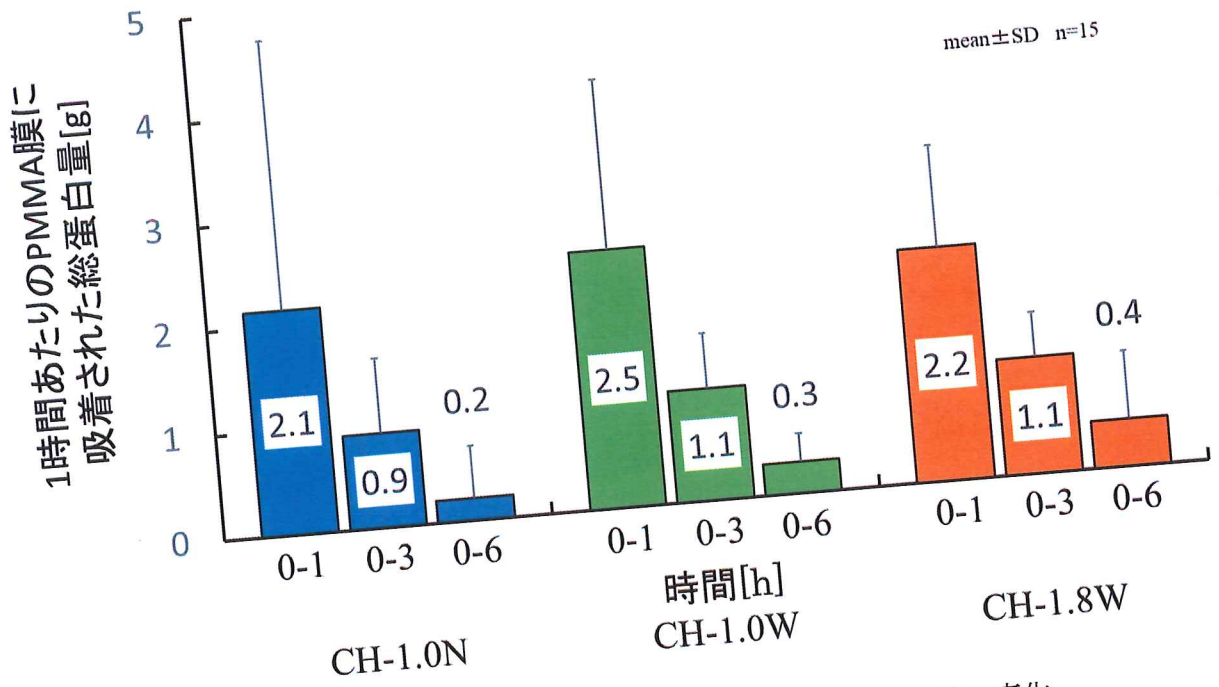


図 3-22 1時間あたりのPMMA膜に吸着された総蛋白量の変化

3-3-5 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタがTMPに与える影響

循環実験中の入口圧、返血圧、ろ過圧を測定し、測定した3種類の圧力からTMPを式2-2より算出した。縦軸はTMP、横軸は実験経過時間を表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8Wで、各群、同様の実験を15回行った。各線が各実験結果としてグラフに表している(図3-23)。

各群、TMPは循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇した。膜面積が大きく、中空糸内径も太いCH-1.8W群で、循環終了基準の循環時間48時間経過してもTMPが上昇しないことが1度だけ生じた。

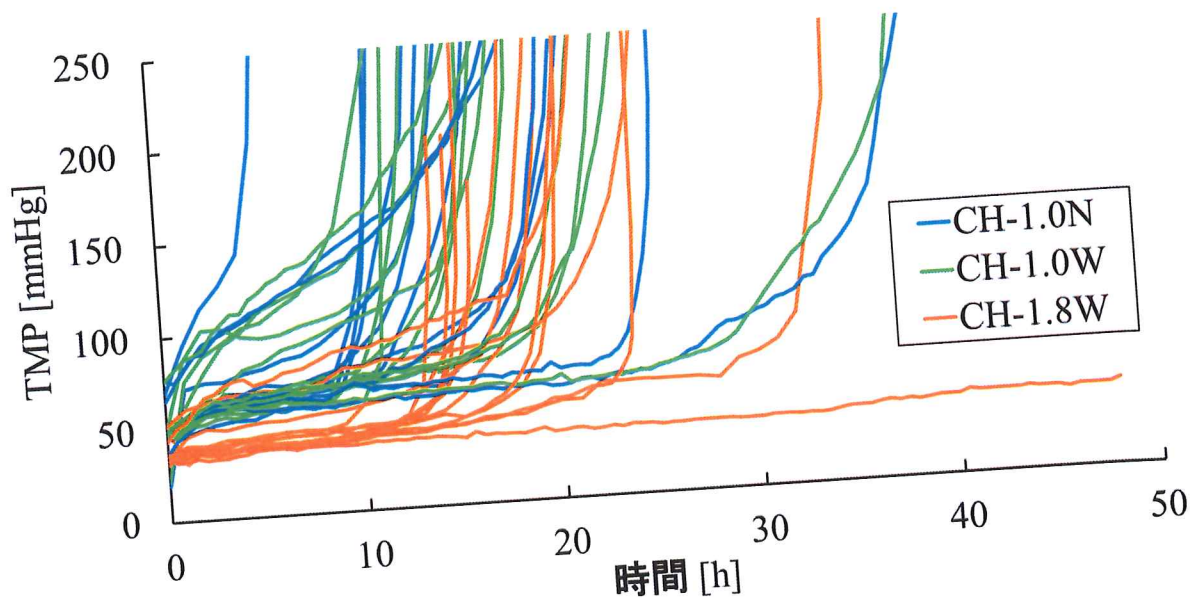


図 3-23 3種類のフィルタのTMPの経時変化

3-3-6 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのTMPが安定している時間の比較

循環実験中の圧力が安定している時間(0~3時間)の各群のTMPを抽出した。縦軸はTMP、横軸は各群別の実験経過時間を表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群で、各群、同様の実験を15回行い、循環実験開始(0)から1時間事のTMPの平均と標準偏差を表している(図3-24)。

圧力が安定している時点におけるTMPは、膜面積が大きいCH-1.8Wは膜面積が小さいCH-1.0NとCH-1.0Wに比べ有意に低値を示した。また、膜面積を増加させたCH-1.8Wは、膜面積の小さいCH-1.0NやCH-1.0Wに比べ初期値(0時間)から3時間までの上昇の割合も低かった。

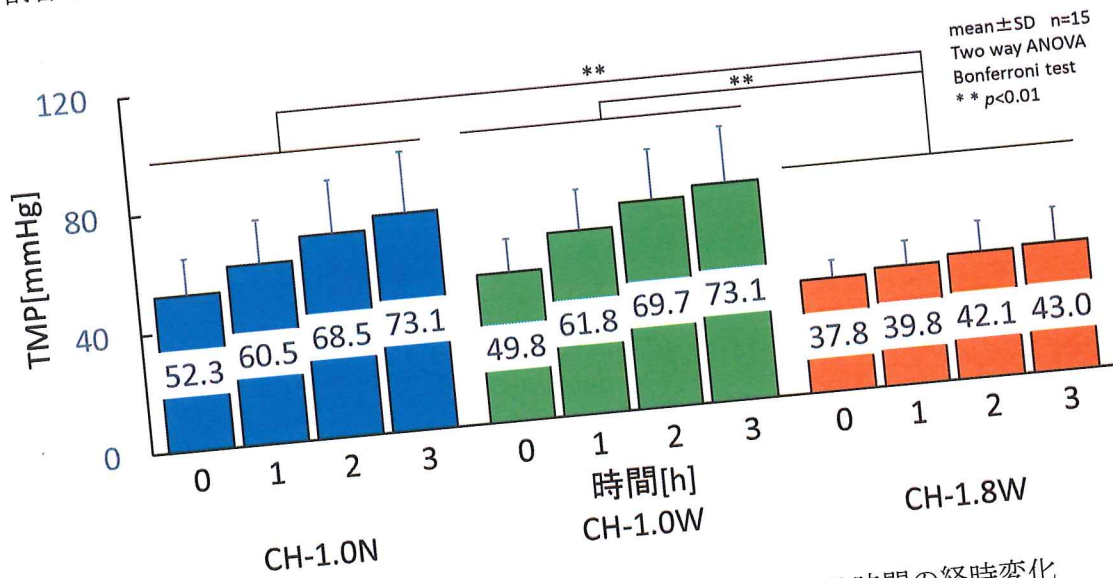


図3-24 3種類のフィルタのTMPが安定している時間の経時変化

3-3-7 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのTMPが200 mmHgに達した時間の比較

循環実験中のTMPの経時変化から、各フィルタにおけるTMPが200 mmHgに達した時間を求めた。縦軸はTMPが200 mmHgに達した時間、横軸は各フィルタを表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群で、各群、同様の実験を15回行い、平均と標準偏差を表している(図3-25)。

膜面積が大きいCH-1.8WのTMPが200 mmHgに達した時間は、膜面積が小さいCH-1.0NやCH-1.0Wに比べ有意に延長した。

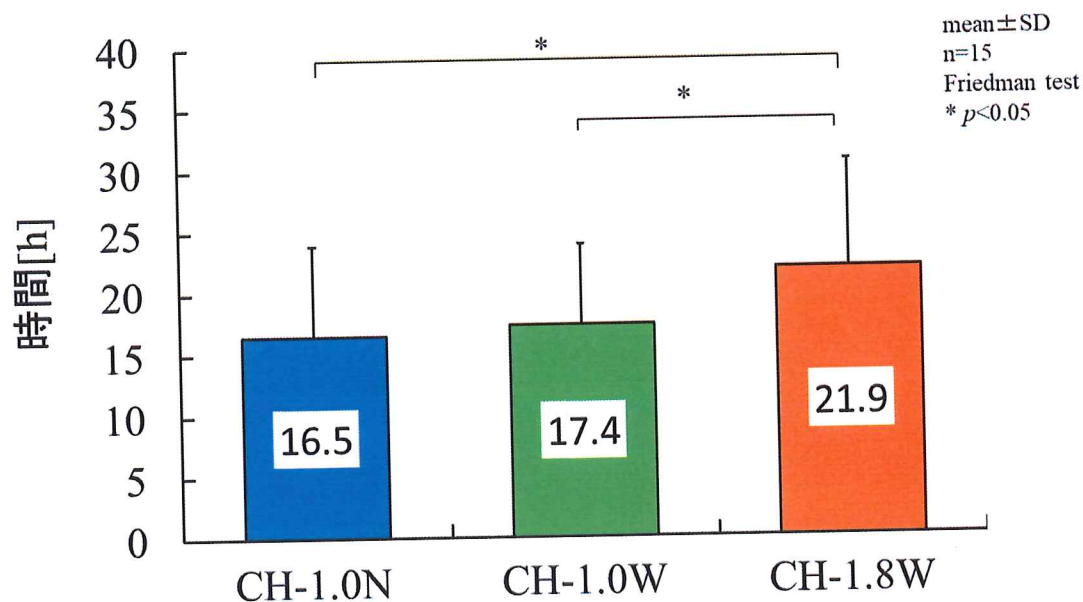


図3-25 3種類のフィルタのTMPが200 mmHgに達した時間

3-3-8 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのTMPから算出したdP/dtの経時変化

循環実験データより算出したTMPから、1時間当たりの変化(dP/dt)を算出した。縦軸はTMPのdP/dt、横軸は実験経過時間を表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群である。各群、同様の実験を15回行い、各線が各実験結果を表している(図3-26)。

各群、TMPのdP/dtも循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇した。膜面積が大きく、中空糸内径も太いCH-1.8W群で、循環終了基準の循環時間48時間経過してもTMPのdP/dtも全く上昇しないことが1度だけ生じた。

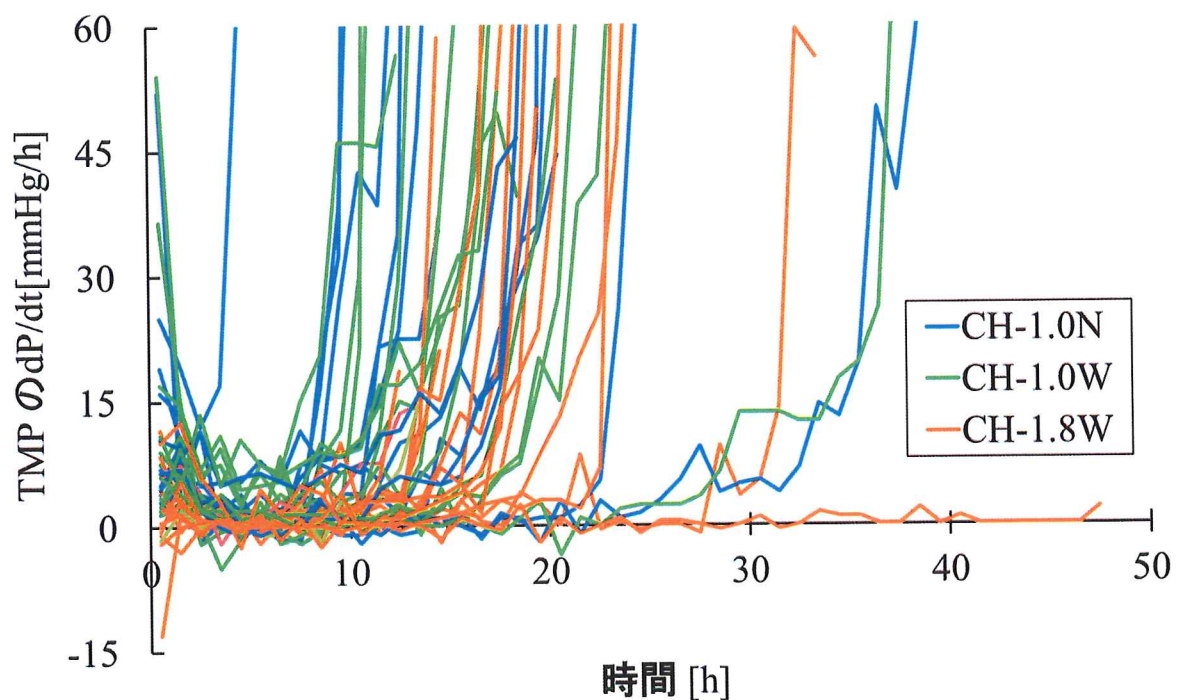


図3-26 3種類のフィルタにおけるTMPのdP/dtの経時変化

3-3-9 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのTMPから算出したdP/dtが15 mmHg/h以上に上昇した時間の比較

循環実験データより算出したTMPのdP/dtの経時変化から、各群におけるTMPが15 mmHg/h以上に上昇した時間を求めた。縦軸はTMPが15 mmHg/h以上上昇した時間、横軸は各フィルタを表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群である。各群、同様の実験を15回行い、平均と標準偏差を表している(図3-27)。

膜面積が大きいCH-1.8WのTMPのdP/dtが15 mmHg/h以上に上昇した時間は、膜面積が小さいCH-1.0NやCH-1.0Wに比べ有意に延長した。

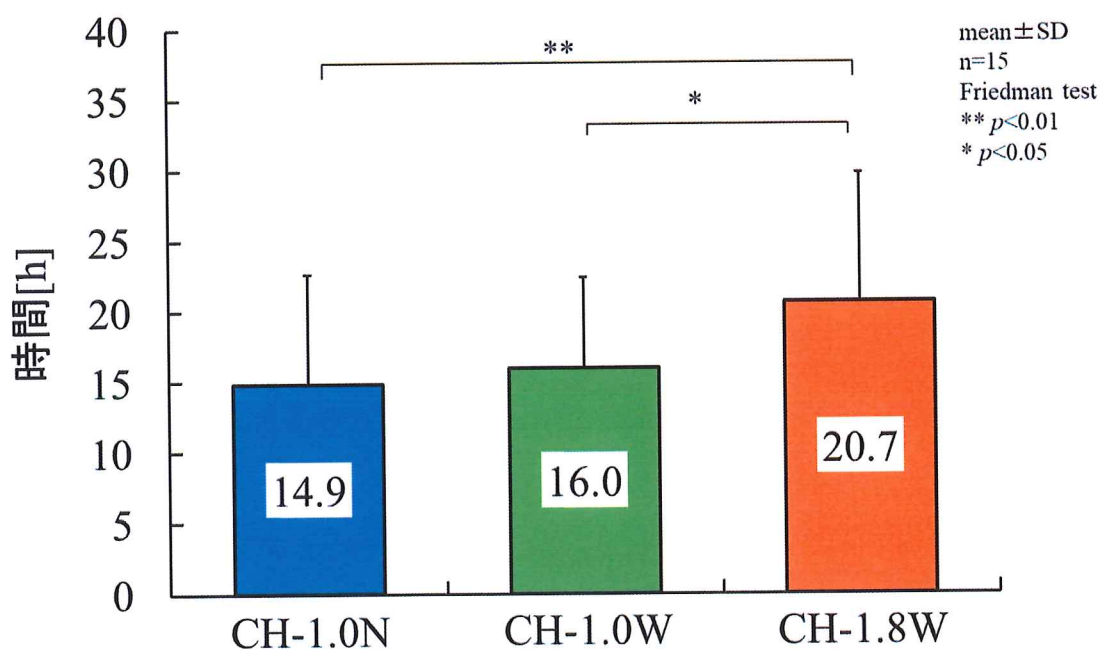


図3-27 3種類のフィルタのTMPのdP/dtが15 mmHg/h以上上昇した時間

3-3-10 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのAV差圧の経時変化

循環実験中の入口圧と返血圧の差よりAV差圧を式2-3より算出した。縦軸はAV差圧、横軸は実験経過時間を表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群である。各群、同様の実験を15回行い、各線が各実験結果を表している（図3-28）。

AV差圧は循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇した。TMPと同様に膜面積も大きく、中空糸内径も太いCH-1.8Wのみ、循環終了基準の循環時間48時間経過してもAV差圧が全く上昇しないことが1度だけ生じた。また、AV差圧が200 mmHgまで達しないで、TMPが400 mmHgに達し実験が終了した結果は、CH-1.0Nで15回中2回、CH-1.0Wで15回中13回、CH-1.8Wで15回中8回あった。

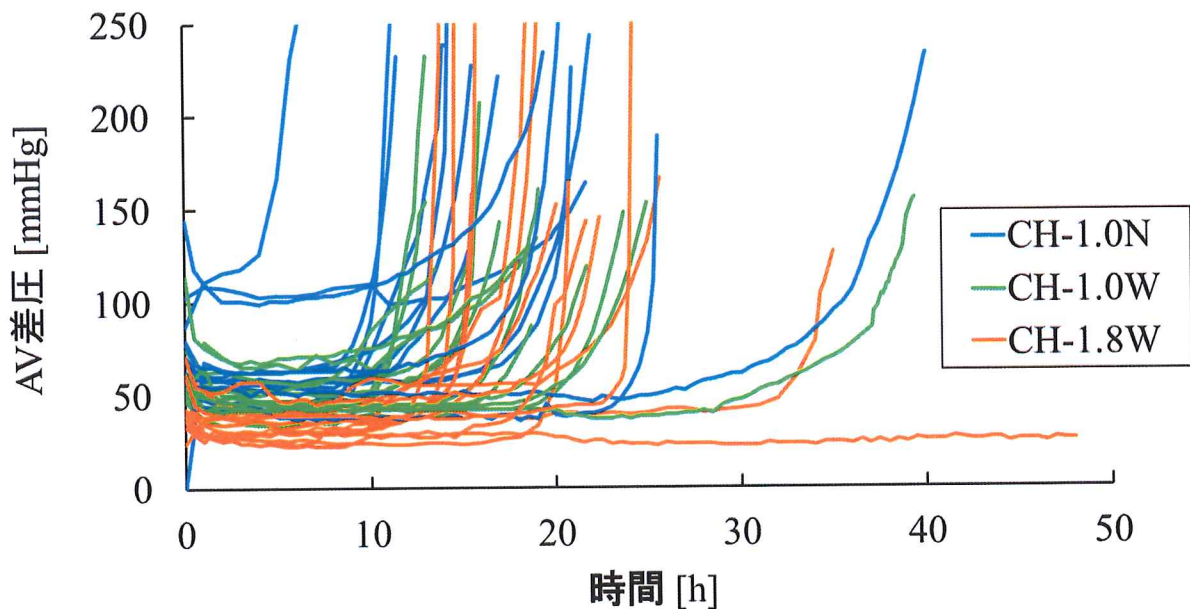


図 3-28 3種類のフィルタのAV差圧の経時変化

3-3-11 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのAV差圧が安定している時間の比較

循環実験中の圧力が安定している時間（0～3時間）の各群のAV差圧を抽出した。縦軸はAV差圧、横軸は各群別の実験経過時間を表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群で、各群、同様の実験を15回行い、循環実験開始（0）から1時間事のAV差圧の平均と標準偏差を表している（図3-29）。

圧力が安定している時点におけるAV差圧は、膜面積が大きいCH-1.8Wは膜面積が小さいCH-1.0NとCH-1.0Wに比べ有意に低値を示した。さらに、中空糸内径が大きいCH-1.0WのAV差圧は、膜面積小さく、中空糸内径が小さいCH-1.0Nに比べて有意低値を示した。

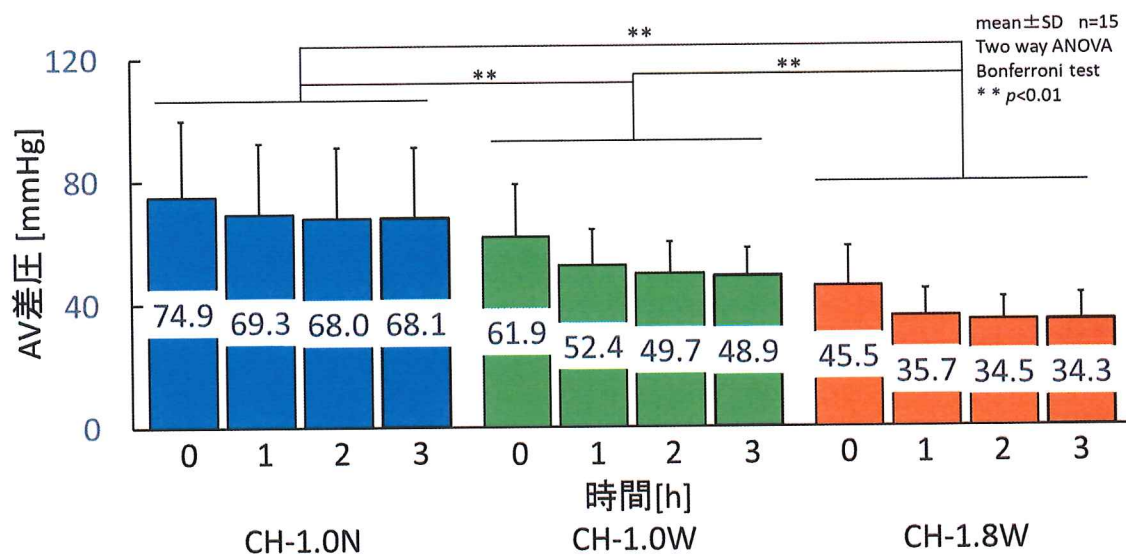


図 3-29 3種類のフィルタのAV差圧が安定している時間の経時変化

3-3-12 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのAV差圧が200 mmHgに達した時間の比較

循環実験中のAV差圧の経時変化から、各フィルタにおけるAV差圧が200 mmHgに達した時間を求めた。縦軸はAV差圧が200 mmHgに達した時間、横軸は各フィルタを表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群で、各群、同様の実験を15回行い、平均と標準偏差を表している(図3-30)。

AV差圧が200 mmHgに達した時間は、TMPが200 mmHgに達した時間と同様に、膜面積が大きいCH-1.8WのAV差圧が200 mmHgに達した時間は、膜面積が小さいCH-1.0NやCH-1.0Wに比べ有意に延長した。

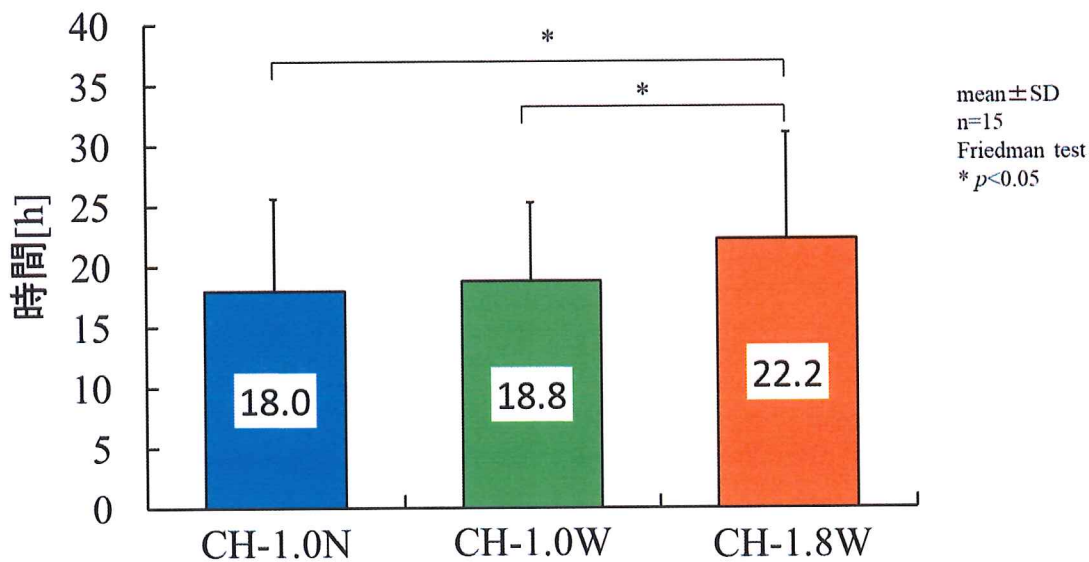


図3-30 3種類のフィルタのAV差圧が200 mmHgに達した時間

3-3-13 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのAV差圧のdP/dtの経時変化

循環実験中において、算出したAV差圧から、1時間当たりの変化(dP/dt)を算出した。縦軸はAV差圧のdP/dt、横軸は実験経過時間を表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群である。各群、同様の実験を15回行い、各線が各実験結果を表している(図3-31)。

各群、AV差圧のdP/dtは、TMPのdP/dtと同様に、循環開始から安定した圧力を数時間維持し、その後ほぼすべての実験で上昇した。膜面積も大きく、中空糸内径も太いCH-1.8W群で、循環終了基準の循環時間48時間経過してもAV差圧のdP/dtも全く上昇しないことが1度だけ生じた。また、AV差圧のdP/dtが15mmHg/h以上上昇しないで、TMPが400mmHgに達し実験が終了した結果は、CH-1.0Nで15回中1回、CH-1.0Wで15回中1回であった。

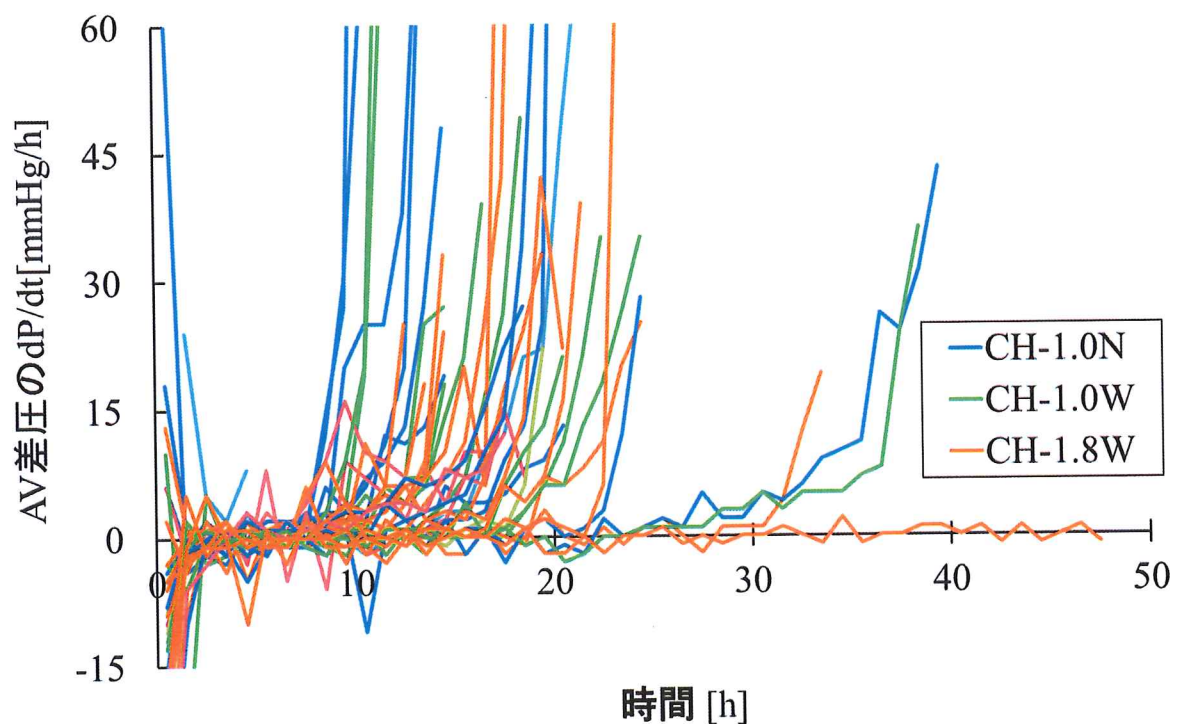


図3-31 3種類のフィルタのAV差圧のdP/dtの経時変化

3-3-14 中空糸内径、膜面積の異なる3種類のフィルタのAV差圧のdP/dtが15 mmHg/h以上上昇した時間

循環実験中のAV差圧のdP/dtの経時変化から、AV差圧が15 mmHg/h以上上昇した時間を求めた。縦軸はAV差圧が15 mmHg/h以上上昇した時間、横軸は各フィルタを表す。また、青がCH-1.0N群、緑がCH-1.0W群、オレンジがCH-1.8W群である。各群、同様の実験を15回行い、平均と標準偏差を表している(図3-32)。

AV差圧のdP/dtが15 mmHg/h以上上昇した時間は、膜面積が大きく、中空糸内径も太いCH-1.8Wが、膜面積が小さく、中空糸内径も細いCH-1.0Nに比べ有意に延長した。

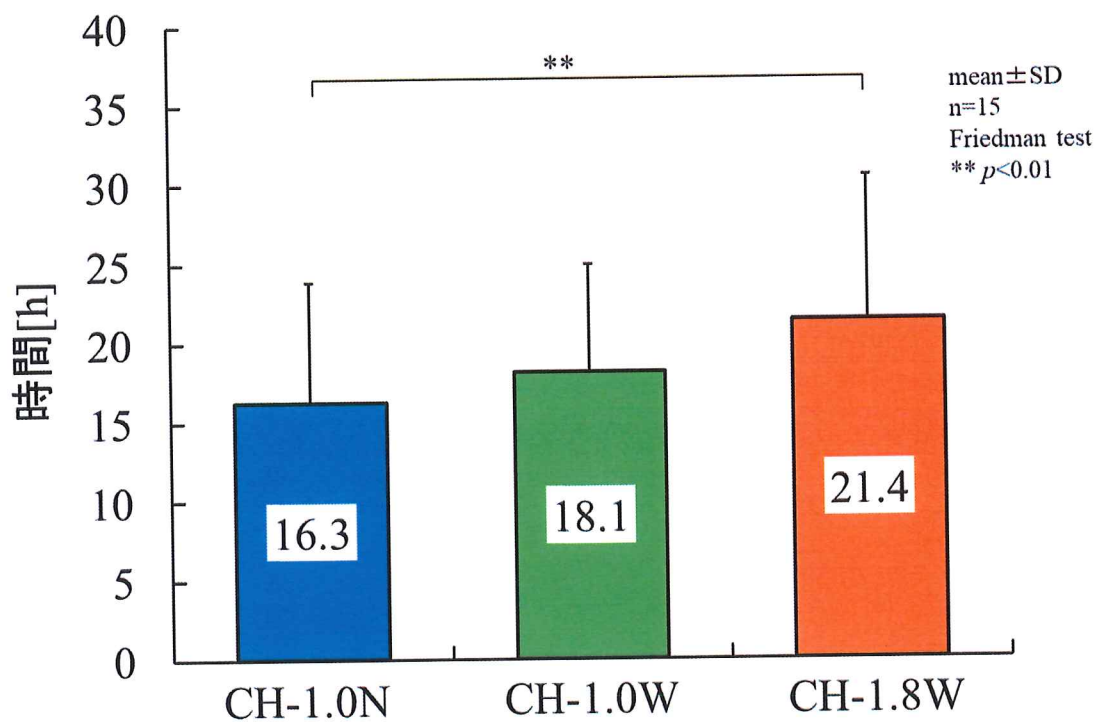


図3-32 フィルタ比較時のAV差圧のdP/dtが15 mmHg/h以上上昇した時間

4 考察

4-1 新鮮血液と購入血液における血液凝固マーカの比較

ATⅢは新鮮血液に比べ購入血液が有意差はないものの若干低値を示し、ばらつきも大きかった。TATは新鮮血液に比べ購入血液が有意に高値を示し、またばらつきも大きかった。Total PAI-1は新鮮血液に比べ購入血液が有意差はないものの若干高値を示し、ばらつきも大きかった。Dダイマーは、購入血液に比べ新鮮血液がばらつきが大きかったが、両群ともすべての測定結果においてヒトの基準値以内に入っていた。

ATⅢは、凝固系カスケードの中でトロンビンや活性第X因子(Xa)と結合し、その作用を阻害する抗凝固因子である。低下していると凝固系カスケードが亢進していることを示す。今回の検討においては、ヒト基準値より高値を示した結果は新鮮血液も購入血液もなかったが、低値を示したのは、購入血液において12回中2回あった。

凝固カスケードが亢進していることを評価するためには、トロンビンを直接測定することが良いが、血中半減期が数秒から十数秒と極めて短いため測定することが難しい。TATはトロンビンとATⅢが結合した複合体であり、トロンビンを間接的に測定でき、増加していると凝固系カスケードが亢進していることを示す(図4-1)。今回のTATの値は、購入血液が新鮮血液に比べ有意に増加し、ヒトの基準値の3 ng/dLより大きくなっているのは、購入血液において12回中7回あり、そのうち10 ng/mL以上の高値は1回のみであった。これより、購入血液は採取時から大学運搬までの間で凝固カスケードが亢進しているものがあつたと考えられた。

PAI-1は、血管内皮細胞の障害によって産生させるマーカであり、血液採取時に血管内皮細胞が障害されると増加すると考えられる。購入血液は12回中2回高値を示した。それ以外は、新鮮血液と購入血液はほぼ同値を示した。これより、高値を示した2回の採血は、血管内皮が障害されるなど採血時に刺激を強く受けていると考えられた。

一方で、線溶系マーカのD-ダイマーの値は、新鮮血液と購入血液で有意差はなかったため、購入血液においてTATが高値を示す凝固系カスケードが亢進していた場合でも、線溶系まで亢進していないと考えられた。

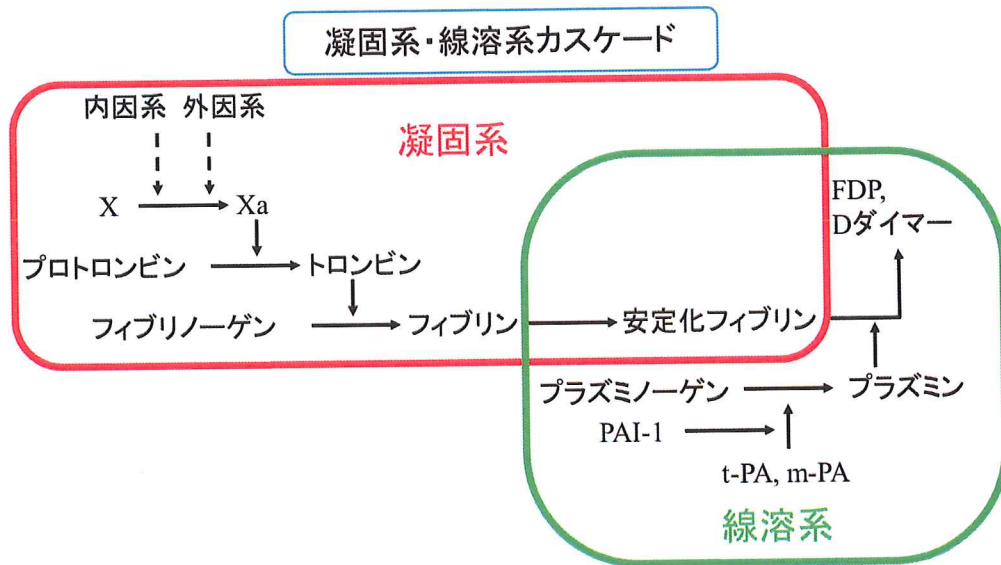


図 4-1 凝固・線溶系カスケード

これより、購入血液は新鮮血液に比べ若干凝固系が活性化している血液もあり、新鮮血液よりもばらつきが多くある。しかしながら、臨床の患者においても凝固・線溶系マーカーは患者ごとのばらつきが大きく、例えば TAT においては、治療開始時に $0.6 \pm 8.8 \text{ ng/mL}$ や $21.4 \pm 17.9 \text{ ng/mL}$ などと報告¹⁰⁾もある。

この購入血液の凝固・線溶系マーカーのばらつきの対応策として、1 頭から採取した血液を数種類に分け、同時に異なるフィルタや操作条件で実験を実施することで、凝固・線溶系マーカーを含めた血液性状の差をなくして実験が可能である。また、実験開始時に凝固・線溶系マーカーを測定し、あまりに変化した血液は除外をする方法を考えた。このような 2 つの対応策を実施することで、購入血液を使用してもフィルタライフタイムを比較検討することが可能であると考えられた。

4-2 購入血液を使用し、CHF を模擬した長時間 *ex vivo* 実験モデルの構築

① ヘマトクリットの経時変化

循環実験中に、ヘマトクリットの変化率は、80~100%の範囲の値で徐々に低下して経過したが、クエン酸三ナトリウム濃度の違う5つの群でヘマトクリット変化率の急激な低下はみられず、クエン酸三ナトリウムの濃度の違いにおけるヘマトクリットの変化率の経時変化に違いはみられなかった。

今回の検討では、臨床と異なり1Lのみの血液を使用し続けているにも関わらず、最長で48時間循環実験を行っても、ヘマトクリットの変化率の急激な低下は認められなかったことから、購入血液を用いたCHFを模擬した長時間 *ex vivo* 循環実験が安定して行われていることが示された。

② 血中総蛋白濃度の経時変化

循環実験中は血中総蛋白濃度変化率が時間経過とともに低下し、循環時間が長いほど低下した。また、クエン酸三ナトリウム濃度の違いによる血中総蛋白濃度の変化率の経時変化に違いはみられなかった。

今回の実験においては循環血液から、濾過により血中の蛋白が除去され、濾液分の補充液が補液される。補充液には、蛋白成分は含まれない。また、PMMA膜は膜材質に蛋白成分を吸着する。

これより本実験においても、濾過と吸着の両効果により時間経過とともに血中総蛋白濃度は減少する実験系であるので、この結果は想定された現象であり、購入血液を用いたCHFを模擬した長時間 *ex vivo* 循環実験が安定して行われていることが示された。

③ ライフタイムの評価時間

本実験での TMP、AV 差圧の経時変化は、循環開始後、数時間安定した値を維持し、その後ほとんどすべての条件で急激に値が上昇した。そのため、膜の細孔が目詰まりした時間としての TMP、中空糸自体が詰まった時間として AV 差圧の閾値は、150～250 mmHg のどの場所をとってもほとんど変わらないことがわかる。

しかしながら、安定している圧力が 100 mmHg 付近の結果が数回あったため、150 mmHg に達するまでの時間は上昇し始めてから、早い時間に達してしまうケースもあり、目詰まりした時間や詰まった時間として評価をするのは、適していないと考えられた。ヘモフィルタには、500 mmHg 以下の圧力で使用することと記載されている。また、フィルタライフタイムに関する研究では、研究ごとに閾値は設定されていることから⁸⁾、本研究では、フィルタライフタイムを求める TMP、AV 差圧の閾値をフィルタの上限圧力値の安全係数を約 1/2 として、200 mmHg と設定した。

TMP、AV 差圧の 1 時間当たりの変化においても、経時変化は TMP と AV 差圧と同様に循環開始後、数時間安定した値を維持し、その後急激に値が上昇した。また、ベースラインが常に 0～5 mmHg/h 前後で変化していた。そこで、1 時間当たりの変化の閾値を 15 mmHg/h 以上であれば、ベースラインの変動の影響を除いてフィルタライフタイムを求められることから、膜の細孔が目詰まりが起こり始めた時間としての 1 時間当たりの TMP 変化と中空糸自体が詰まり始めた時間の 1 時間当たりの AV 差圧変化を 15 mmHg/h 以上とした。

④ 各クエン酸三ナトリウム濃度におけるフィルタのライフタイム

クエン酸三ナトリウム濃度 0 mM 群、6 mM 群では、フィルタのライフタイムが 10 時間以内と短い時間で凝固が起こってしまった。また血液バッグや返血側のチャンバで凝固が起こってしまったため、長時間 *ex vivo* 実験モデルの条件を満たしていないため、フィルタのライフタイムを評価するモデルとしては不適切であると考えられた。

クエン酸三ナトリウム濃度 10 mM 群では、フィルタのライフタイムとして評価した時間が 40 時間程度と長く、さらに、循環実験終了時間の 48 時間経過した時点でも TMP や AV 差圧がフィルタライフタイムまで達することなく終了した実験も多くあった。また、循環時実験開始後 48 時間を超えると血液の腐敗や溶血などの問題が多くなることを経験しているため、10 mM もフィルタのライフタイムを評価するモデルとして不適切であると考えられた。

クエン酸三ナトリウム濃度 7 mM 群と 8 mM 群では、血液バッグやチャンバなどで凝固は発生せず、フィルタのライフタイムは 7 mM 群では、平均 17 時間程度、8 mM 群では、平均 27 時間程度だった。これより、フィルタライフタイムとして最も適しているクエン酸三ナトリウムの濃度であると考えられた。

血液バッグやチャンバなどフィルタ以外での凝固が発生しやすいクエン酸三ナトリウム濃度 0 mM、6 mM と、フィルタのライフタイムに達しないクエン酸三ナトリウム濃度 10 mM では、TMP が 200 mmHg に達した時間と AV 差圧が 200 mmHg に達した時間の間に有意な差はみられなかった。一方、フィルタのライフタイム評価モデルとして適していると考えられたクエン酸三ナトリウム濃度 7 mM、8 mM では、TMP が 200 mmHg に達した時間に比べ、AV 差圧が 200 mmHg に達した時間は有意に高値を示した。これより、今回構築したモデルは、膜の細孔が先に目詰まりを起こし、その後中空糸自体が詰まるモデルであった。

これより、今回購入したブタ血液を用いて、抗凝固剤のクエン酸三ナトリウム濃度を 7 mM、8 mM 補液に添加して循環実験を行うと、まず膜の細孔が目詰まり、その後、中空糸自体が詰まることで、フィルタライフタイムに達する評価モデルを構築することができたと考えられた。

⑤ 血中カルシウム濃度や血中イオン化カルシウム濃度

今回の検討では、抗凝固剤としてメシル酸ナファモスタットに加え、クエン酸三ナトリウムを補液内に添加することで、フィルタライフタイムを評価可能なモデルを構築した。クエン酸三ナトリウムは、血中のカルシウムイオンをキレートして抗凝固作用を発現するため、血中カルシウム濃度や血中カルシウムイオン濃度が低下することがある。

今回の検討でも、血中カルシウム濃度を酵素法（ダイアカラーリキッド Ca：東洋紡）にて測定し、クエン酸三ナトリウム濃度 8 mM 時の血液サンプルの一部で測定し評価した。縦軸は血中カルシウム濃度、横軸は実験経過時間を表す。5 回測定を行い、実験開始から 0～10 時間までの平均と標準偏差を表している（図 4-2）。

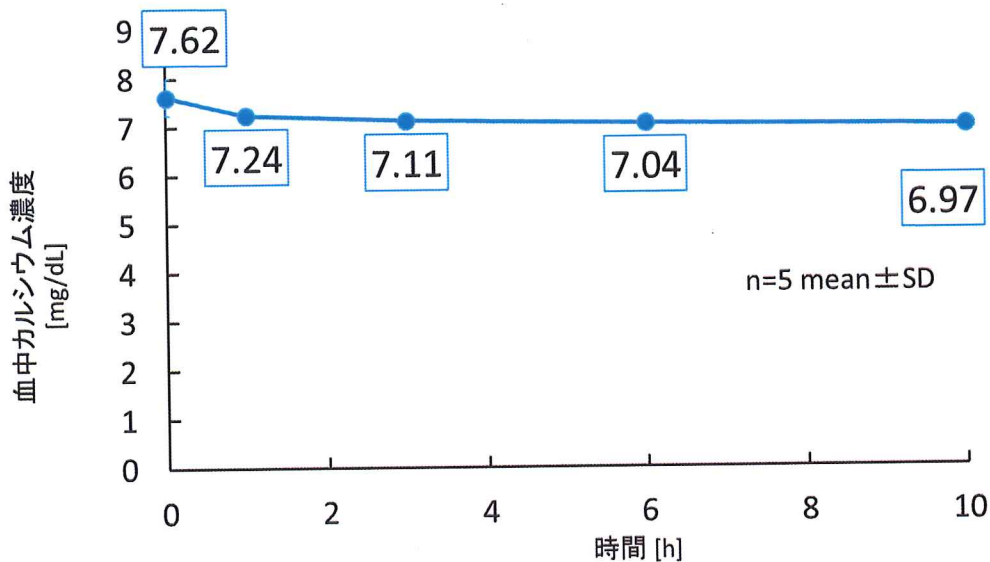


図 4-2. 血中カルシウム濃度の推移

今回補液として使用したサブラッドのカルシウム濃度は 7.0 mg/dL である。これより、実験開始は平均 7.62 mg/dL とサブラッドのカルシウム濃度より高値であるが、経時的に低下し、実験開始から 3 時間程度経過すると、血中のカルシウム濃度はサブラッドのカルシウム濃度に置換され、7.0 mg/dL 前後で推移した。これより、クエン酸三ナトリウムを抗凝固剤として本検討で使用しても、血中のカルシウム濃度に与える影響は少なく、サブラッドの濃度に依存すると考えられた。

また、ブタ血液のイオン化カルシウム濃度をサブラッド内の電解質濃度やクエン酸三ナトリウム濃度などからシミュレーション¹⁰⁾にて計算したところ、クエン酸三ナトリウム濃度 6 mM では 9.2 μ M、7 mM では 7.3 μ M、8 mM では 6.0 μ M、10 mM では 4.5 μ M であった。この計算結果より、その値自体は小さく、また各クエン酸三ナトリウム濃度間における差は少なかった。

これより、血中カルシウム濃度はサブラッドの濃度に依存するので開始時より低値を示し、血中イオン化カルシウム濃度の絶対値も低いことから、膜の細孔の目詰まりや中空糸自体の詰まりに、血中カルシウム濃度およびイオン化カルシウム濃度が与える影響は少ないと考えられた。

⑥ 構築したモデルのリミテーションおよび今後の課題

今回の検討において、補液にサブラッドを使用し、濾液を捨てる実験モデルにおいて検討を実施した。また、臨床と同様の血液流量や濾過流量、補液流量で実験を実施した。

臨床における血液量は体重の 1/13 (約 3~6 L) であり、治療中にも赤血球や蛋白質などの生成や崩壊が連続的に行われている。一方今回の検討では 1 L のみを使用し連続的に実験を実施しているため、血中総蛋白濃度の低下は臨床よりも早くなっていると考えられる。また、ヘモフィルタを通過することや血液ポンプなどによる血球のストレスも今回の検討では、臨床の条件よりも高くなったと考えられる。これより、今回構築したモデルは、臨床の CHF 治療を加速評価するモデルであると考えられた。

ヘマトクリットや血中総蛋白濃度を調節するには、血液を遠心分離する必要があるが、遠心分離は血小板の活性化を起こすため、今回の検討では実験開始時のヘマトクリットや血中総蛋白濃度の調整は実施しなかった。血液のヘマトクリットや血中総蛋白濃度の調整は実施しなかったが、TMP や AV 差圧の経時変化及びフィルタのライフタイムのばらつきは大きくなり、TMP や AV 差圧やライフタイムを評価できていると考えられた。それに加え、一頭から採取した血液を数種類に分け、フィルタの違いや操作条件の違いの検討を同時に実施することで、血液の個体差の影響を排除することが可能である¹²⁾。

4-3 中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタのライフタイムや蛋白除去性能の検討

① ヘマトクリットの経時変化

循環実験 6 時間以内では、どのフィルタでもヘマトクリットは時間経過で緩やかに低下傾向だったが、各フィルタ間のヘマトクリットに有意な差はみられなかった。中空糸内径、膜面積の異なる 3 種類のフィルタを用いた実験でも、ヘマトクリットは安定し、4-2 と同様に、循長時間 *ex vivo* 循環実験が安定して行われていることが示された。

② 蛋白除去性能の経時変化

血中総蛋白濃度は中空糸内径が太い CH-1.0W と CH-1.8W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に低値を示した。また、PMMA 膜に吸着された総蛋白量は、中空糸内径が太い CH-1.0W と CH-1.8W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に高値を示した。

中空糸内径が異なる中空糸では、細孔径分布など中空糸自体の構造が異なることで、中空糸の吸着特性が異なっている可能性が考えられた。

① 圧力安定時の TMP と AV 差圧の経時変化

・ TMP における経時変化

実験開始時から圧力が安定している間の TMP は、膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0W と CH-1.0N に比べ有意に低値を示した。

中空糸の平均濾過流束は、単位時間当たり、かつ単位膜面積当たりに血液側から濾液側に流れる濾液量のことである。ここで今回の検討において使用した 3 種類のフィルタの濾過流束を以下の式 4-1 で算出した。

$$\text{平均濾過流束} = \frac{Q_F}{S} \cdot \cdot \cdot (4-1)$$

(濾過流量 : Q_F 、膜面積 : S)

その結果、膜面積を増加させることで、中空糸の平均濾過流束は低下する (表 4-1)。

表 4-1 平均濾過流束

フィルタ	CH-1.0N	CH-1.0W	CH-1.8W
平均濾過流束 (mL/min/m ²)	10.0	10.0	5.56

これより、圧力が安定している時の TMP は、膜の血液側と濾液側の圧力差であるため、今回の検討のように同じ濾過流量で使用するとき、膜面積が大きいほど単位膜面積当たりの平均濾過流束が低下する (表 4-1) ため、膜面積が大きい CH-1.8W は膜面積が小さい CH-1.0N や CH-1.0W に比べ有意に低値を示したと考えられた。

・ AV 差圧における経時変化

圧力が安定している時点における AV 差圧は、膜面積が大きい CH-1.8W は膜面積が小さい CH-1.0N と CH-1.0W に比べ有意に低値を示し、膜面積は同じで中空糸内径が太い CH-1.0W は中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に低値を示した。

中空糸 1 本当たりの血液流速とは、単位時間あたりに血液が移動する長さのことである。

ここで今回の検討において使用した 3 種類のフィルタの中空糸 1 本当たりの血液流速を以下の式 4-2 で算出した。

$$\text{血液流速} = \frac{Q_B}{N\pi r^2} \dots (4-2)$$

(血液流量 : Q_B 、算出中空糸本数 : N 、中空糸半径 : r)

計算の結果、中空糸 1 本当たりの血液流速は、CH-1.0N と比べて中空糸内径が太く、膜面積が大きい CH-1.8W が一番遅く、次いで、中空糸内径が太く、膜面積が小さい CH-1.0W、最後に中空糸内径が細く、膜面積も小さい CH-1.0N の順になった (表 4-2)。

表 4-2 中空糸 1 本当たりの血液流速

フィルタ	CH-1.0N	CH-1.0W	CH-1.8W
血液流速(cm/s)	0.65	0.54	0.30

圧力が安定している時の AV 差圧は、中空糸 1 本当たりの血液流速に依存すると考えられるため、CH-1.0N>CH-1.0W>CH-1.8W になったと考えられた。

② ライフタイム

フィルタのライフタイムは、膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0W や CH-1.0N に比べ有意に高値を示したが、中空糸内径による差はみられなかった。

中空糸内の濾過流束に対して血液流速が十分に大きい時、中空糸膜表面に蛋白質がたまりにくい (図 4-3)。一方で、中空糸内の濾過流束に対して血液流速が十分に小さいと、中空糸膜表面に蛋白質がたまり、濃度分極層が形成され、細孔の目詰まりが起こりやすい (図 4-4)。

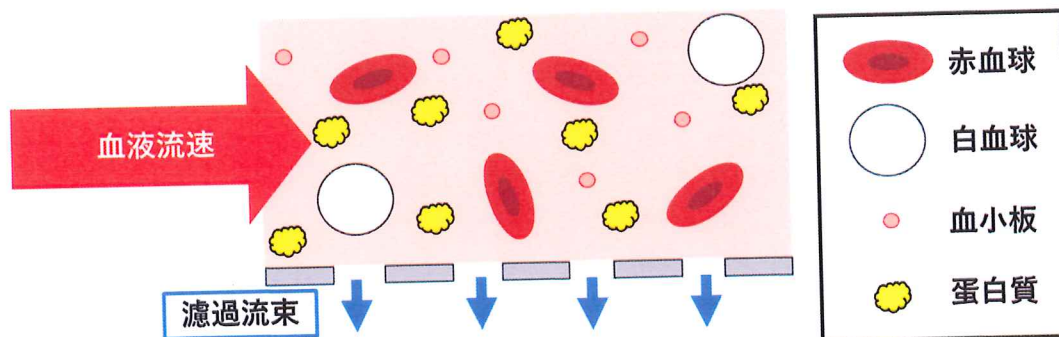


図 4-3、中空糸内の濾過流束に対して血液流速が十分に大きい場合

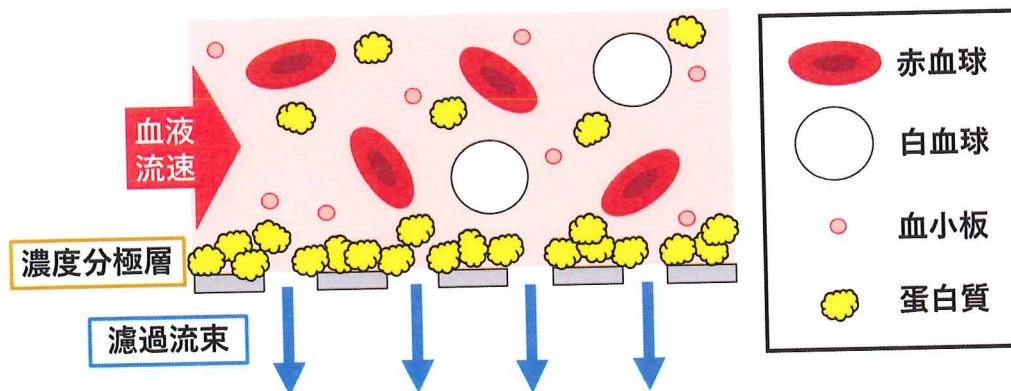


図 4-4、中空糸内の濾過流束に対して血液流速が十分に小さい場合

次に、濃度分極層モデルから計算される中空糸の膜面蛋白濃度は式 4-3 で求められる¹³⁾。

$$\ln \frac{C_m}{C_b} = \frac{J_v}{k} \cdot \cdot \cdot (4-3)$$

(中空糸膜面蛋白濃度 : C_m 、血液蛋白濃度 : C_b 、平均濾過流束 : J_v 、物質移動係数 : k)

この時、 J_v は圧力安定時の TMP の継時変化の時の式 4-1 で計算される。一方、 k は式 4-4 で求められる¹⁴⁾。

$$k = 0.816 \left(D_w \frac{\gamma_w}{L} \right)^{0.33} \cdot \cdot \cdot (4-4)$$

(拡散係数 : D_w 、壁ずり速度 : \square_w 、有効長 : L)

また、式 4-4 の中の γ_w は式 4-5 によって求められる。

$$\gamma_w = \frac{4U_B}{r} \cdot \cdot \cdot (4-5)$$

(血液流速 : U_B 、中空糸半径 : r)

式 4-3 を式 4-1、式 4-4、式 4-5 を使用して求めた。この時、拡散係数はアルブミンの拡散係数の $90 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ¹⁵⁾ を使用し計算した。また、式に含まれるフィルタの条件は表 2-5 の値を使用し、また血中総蛋白濃度の測定結果も使用した。

縦軸はシミュレーションにより計算した中空糸膜面蛋白濃度、横軸は実験経過時間を表す。15 回の血中総蛋白濃度の測定結果から各実験の中空糸膜面蛋白濃度を計算し、実験開始から 0~6 時間までの平均と標準偏差を表している (図 4-5)。

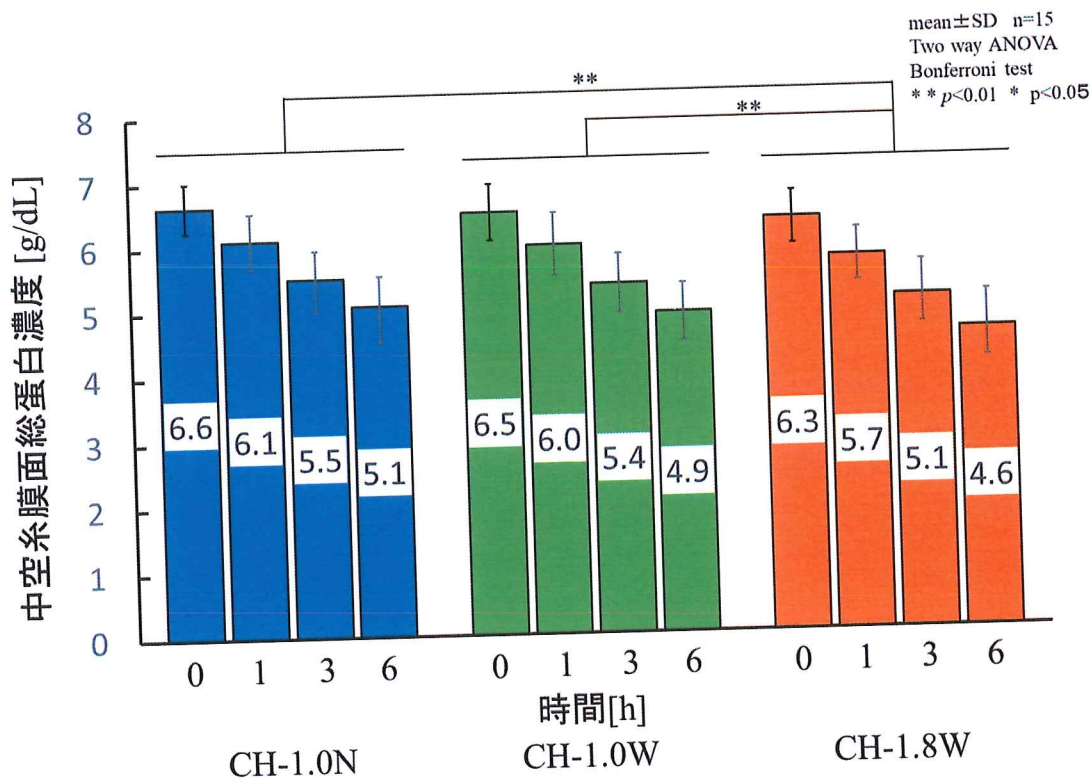


図 4-5. シミュレーションにより計算した中空糸膜面濃度の経時変化

この結果より、膜の細孔の目詰まり影響を与える中空糸膜面の蛋白濃度は、膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N と CH-1.0W に比べ有意に低値を示した。

これより、膜面積が大きい CH-1.8W では、膜面積の増加と、膜面積の増加による壁ずり速度の低下によって、中空糸の膜面濃度が低くなり、膜面積が小さい CH-1.0N や CH-1.0W に比べフィルタライフタイムは有意に延長したと考えられた。

また、今回の検討において CH-1.8W が 15 回中 1 回のみ TMP や AV 差圧が 48 時間上昇しないデータがあった。この血液を使用して同時に実験を施行した CH-1.0N の TMP が 200 mmHg に達した時間も 36.68 時間、CH-1.0W の TMP が 200 mmHg に達した時間も 36.52 時間であり両フィルタとも 15 回中最も延長した結果であった。これより、元々の血液の状態により CH-1.8W が 48 時間経過しても、圧力が上昇しなかったと考えられた。

しかしながら、1 頭から採取した血液を 3 つに分け同時に実験を実施しているので、元々の血液の状態の影響を可能な限り軽減して、3 種類のフィルタのフィルタライフタイムを評価できていると考えられた。

③ 今回の中空糸内径や膜面積を変化させた3種類のフィルタの比較検討のリミテーションおよび今後の課題

今回膜面積や中空糸内径の違いがフィルタライフタイムに与える影響を比較検討したが、1つの操作条件（血液流量 100 mL/min、補液・濾液流量 10 mL/min）でのみしか検討を実施していない。中空糸1本当たりの血液流速は3つのフィルタで異なっていたため、血液流速をそろえて実験を実施することや、濾液流量を変化させた場合など、操作条件を変えることでフィルタのライフタイムは変わる可能性があるため、今後の検討が必要である。

今回の検討において溶質除去性能は総蛋白のみしか検討していない。今後は、フィルタライフタイムの評価に加えて、小分子から炎症性サイトカインなどの低分子量蛋白領域までの溶質除去性能に関しても検討を実施することが必要であると考えられた。

今回の検討では、1種類の膜材質のPMMA膜のみ検討を実施した。今後は、他の膜材質なども検討を実施する必要があると考えられた。

5 総括

購入したブタ血液を使用しても、クエン酸三ナトリウムを 7 mM もしくは 8 mM で添加することで、一定条件下で膜の細孔の目詰まりが起こり、その後中空糸自体が詰まることでフィルタライフタイムを評価可能な *ex vivo* CHF 実験モデルを構築できた。

構築したモデルを用いて、3 種類の PMMA 膜のフィルタを比較したところ、フィルタライフタイムには、中空糸の膜面濃度が低く膜面積が大きい CH-1.8W が、膜面積が小さい CH-1.0N と CH-1.0W に比べ有意に高値を示した。一方、血中総蛋白濃度は中空糸内径が太い CH-1.0W と CH-1.8W が、中空糸内径が細い CH-1.0N に比べ有意に低値を示した。

6 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導ご助言を頂き本当にありがとうございました。臨床工学研究室の小林弘祐教授や小久保謙一准教授、小林こず恵助教には本研究を始める前の段階から研究の細部までご指導いただきまして大変お世話になりました。深く感謝いたします。

研究を実施するにあたり、血液回路やフィルタのご提供をしていただいた東レ株式会社の皆様にも厚く御礼を申し上げます。

私が博士在籍していた間の臨床工学研究室に所属した4年生や大学院生の後輩たち、特に修士まで進学して一緒に数年間研究を実施した小林裕太君、植木駿一君や、1年間一緒に卒業研究を実施した細谷裕一君、渡部沙己さん、吉田裕平君、須貝光司君には、実験を一緒に行ったり、食事を一緒に食べたり、優秀な後輩たちに囲まれ、公私ともどもとても充実し、また楽しい時間を過ごしたと思っています。ありがとうございました。

最後になりましたが、埼玉から応援してくれていた両親や親戚にも感謝します。

ご協力してくれた皆様方に厚く御礼申し上げます。

平成31年2月13日

栗原佳孝

7 引用文献

- 1) Hirasawa H, Oda S and Matsuda K : Continuous hemodiafiltration with cytokine-adsorbing hemofilter in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Contrib Nephrol* 2007;156:365–70.
- 2) Hirasawa H, Oda S, Nakamura M, Watanabe E, Shiga H and Matsuda K : Continuous hemodiafiltration with a cytokine-adsorbing hemofilter for sepsis. *Blood Purif* 2012;34:164–70.
- 3) Matsuda K, Hirasawa H, Oda S, Shiga H and Nakanishi K : Current Topics on Cytokine Removal Technologies. *Therapeutic Apheresis* 2001;5:306–314
- 4) Matsuda K, Moriguchi T, Harii N and Goto J : Comparison of efficacy between continuous hemodiafiltration with a PMMA membrane hemofilter and a PAN membrane hemofilter in the treatment of a patient with septic acute renal failure. *Transfusion Apher Science* 2009;40:49–53
- 5) Matsumura Y, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Watanabe E, et al : Treatment of septic shock with continuous HDF using 2 PMMA hemofilters for enhanced intensity. *Int J Artif Organs* 2012;35:3–14
- 6) 大石義英、高畑智浩、稲垣伸洋、秋月登、石井孝典、砂子澤裕、他 : 敗血症治療におけるポリメチルメタクリレート (PMMA) 膜使用直列二重接続持続的血液濾過透析 (Series Double PMMA-CHDF) の高サイトカイン血症に対する有用性. *日急性血液浄化誌* 2013;4:28-33
- 7) Miyamoto T, Yoshimoto A, Tatsu K, Ikeda K, Ishii Y, Kobayashi T. Zero mortality of continuous veno-venous hemodiafiltration with PMMA hemofilter after pediatric cardiac surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2011;17:352–5
- 8) 仲松晋也、大浜和也、塚本功、村杉浩、宮崎真一、山下芳久、他 : 持続的血液浄化療法 (CBP) 治療モード別における hemofilter の性能評価. *ICU と CCU* 2008;32 別冊:S137-S142
- 9) 白水和宏、杉森宏、藤吉哲宏、坂口嘉郎、橋爪誠 : 急性腎不全患者に対する持続的血液濾過透析におけるポリスルホン膜とポリメチルメタクリレート膜との有効性の比較. *日集中医誌* 2012;19:419-20
- 10) 福田理史、高須修、山下典雄、鍋田雅和、山香修、木嶋涼二他 : 持続腎代替療法症例における回路内凝固を予測する指標についての検討. *日急性血液浄化誌* 2016;7:38-43
- 11) Robertson WG. Measurement of ionized calcium in biological fluids. *Clin Chim Acta.* 1969;24:149–57.
- 12) Kokubo K, Kurihara Y, Tsukao H, Maruyama N, Kobayashi K, Shinbo T, et al : Effects of increased surface coverage of polyvinylpyrrolidone over a polysulfone hemofilter membrane on permeability and cell adhesion during continuous

hemofiltration. J Artif Organs 2015;18:257-63

- 13) J.G.Wijmans, S Nakao, C.A. Smolders : Flux limitation in ultrafiltration: osmotic pressure model and gel layer model. J Membrane Science 1984;20:115-24
- 14) Colburn AP : A method of correlating forced convection heat transfer data and a comparison with fluid friction. Trans Am Inst Chem Eng 1933;29:174-210
- 15) 吉田文武、酒井清孝 : 化学工学と人工臓器, 共立出版, 東京, 1993, p.183-91.

8 業績目録

(I) 主学術論文 (英文原著)

- ◎ 1. Kurihara Y, Ueki S, Kokubo K, Kobayashi Y, Ebine T, Murakami K, Ushiroda Y, Maruyama N, Tsukao H, Kobayashi K, Kobayashi H: Continuous hemofiltration model using porcine blood for comparing filter life. *J Artificial Organs*,21:332~339,2018.

(II) 原 著 (主学術論文を除く)

- 1. 栗原佳孝、小林裕太、後田洋輔、塚尾浩、小林こず恵、小久保謙一、小林弘祐：大膜面積ポリメチルメタクリレート膜へモフィルタのライフタイムと蛋白吸着量の *in vitro* 評価。日本急性血液浄化学会誌、7:31~37,2016.
- 2. Kokubo K, Kurihara Y, Tsukao H, Maruyama N, Kobayashi K, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi H: Effect of increased surface coverage of polyvinylpyrrolidone over a polysulfone membrane hemofilter on permeability and cell adhesion during continuous hemofiltration. *J Artificial Organs*,18:257~263,2015.
3. 海老根智代、小久保謙一、栗原佳孝、丸山直子、塚尾浩、小林弘祐：急性血液浄化療法において濾過流量や膜の細孔半径がクリアランスに与える影響—細孔モデルおよび物質移動モデルを用いたシミュレーション評価—。日本急性血液浄化学会誌、4:49~56,2013.
4. 村上佳弥、小久保謙一、栗原佳孝、上羽正洋、塚尾浩、丸山直子、松田兼一、小林弘祐：間歇的血液透析と持続的血液濾過を組合わせた治療における尿素窒素濃度変化のシミュレーション解析。日本血液浄化技術学会会誌、21:162~165,2013.

(III) 著 書

1. 小久保謙一、芝真佐樹、上羽正洋、栗原佳孝、塚尾浩、小林弘祐：対向流増幅効果を利用した人工尿細管システムの開発、*全人力・科学力・透析力・for the people 透析医学*。大阪、医薬ジャーナル、193~196, 2014.

(IV) 総説・講座

1. Kokubo K, Kurihara Y, Kobayashi K, Tsukao H, Kobayashi H: Evaluation of the Biocompatibility of Dialysis Membranes. *Blood Purification*,40:293~297,2015.

(V) 症例・臨床治験・その他

1. 栗原佳孝、齋藤毅、櫻井健治、細谷広海、山内芙美、鈴木歩、佐々木奈保子、黒澤香織、大居沙友里、谷林由美：低分子量蛋白の除去率算出時の血液濃縮の補正方法についての検討。
腎と透析、85 別冊 HDF 療法'18:147~149,2018.
2. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、黒澤香織、栗原佳孝、佐々木奈保子、大居沙友里、鈴木歩、山内芙美、鎌田けい子、佐々木千秋、谷林由美：HD から前希釈オンライン HDF への変更後の QOL の変化について—SF-8 (Short Form-8) を用いた 6 か月間の検討—。
腎と透析、85 別冊 HDF 療法'18:62~65,2018.
3. 齋藤毅、山内芙美、細谷広海、栗原佳孝、鈴木歩、谷林由美、大居沙友里、黒澤香織、櫻井健治：低アルブミン血症を伴う長期透析患者に対する高効率 HDF 治療について。
腎と透析、83 別冊 HDF 療法'17:216~219,2017.
4. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、黒澤香織、栗原佳孝、佐々木奈保子、大居沙友里、鈴木歩、山内芙美、鎌田けい子、佐々木千秋：Restless Legs Syndrome の再発症例の治療について。
腎と透析、83 別冊 HDF 療法'17:184-185,2017.
5. 栗原佳孝、齋藤毅、櫻井健治、山内芙美、細谷広海、鈴木歩、池邊奈保子、黒澤香織、谷林由美、鎌田けい子：前希釈 on-line hemodiafiltration の有用性についての検討—SF-8 (Short Form-8) を用いた QOL 評価—。
腎と透析、81 別冊 HDF 療法'16:133~135,2016.
6. 松田兼一、森口武史、菅原久徳、後藤順子、山根隆志、小久保謙一、栗原佳孝、小林こず恵、山本健一郎、丸山修：特集 血液浄化装法の「今」-救急医がキャッチアップすべきトピックス 各論：何をを使うか、どのように使うか 可搬型血液浄化システム。
救急医学、40:1439~1446,2016.
7. 栗原佳孝、齋藤毅、櫻井健治、細谷広海、山内芙美、鈴木歩、黒澤香織、大居紗友里、谷林由美、山下明泰：Pre-dilution on-line HDF の分子量別透析量の検討。腎と透析、81 別冊 ハイパフォーマンスメンブレン'16:88~91,2016.
8. 栗原佳孝、齋藤毅、櫻井健治、山内芙美、細谷広海、鈴木歩、池邊奈保子、黒澤香織、谷林由美、鎌田けい子：前希釈 on-line hemodiafiltration の有用性についての検討—Short Form-8 (SF-8) を用いた QOL 評価—。
腎と透析、81 別冊 HDF 療法'16:133~135,2016.
9. 栗原佳孝、齋藤毅、櫻井健治、山内芙美、細谷広海、池邊奈保子、谷林由美、平田恵一、山下明泰：前希釈 on-line HDF は FGF-23 の除去に優れているか？。
腎と透析、79 別冊 ハイパフォーマンスメンブレン'15:123~125,2015.
10. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、栗原佳孝、池邊奈保子、平田恵一、山内芙美、谷林由美、小久保謙一：ニプロ社製ヘモダイアフィルタ FIX-210S の性能評価。
腎と透析、79 別冊 ハイパフォーマンスメンブレン'15:56~58,2015.

- 1 1. 小久保謙一、栗原佳孝、塚尾浩、小林こず恵、小林弘祐：生体適合性という視点からのアプローチ。
日本血液浄化技術学会会誌、23:236～238,2015.
- 1 2. 西川優希、眞隆一、小林裕太、栗原佳孝、小林こず恵、塚尾浩、小久保謙一、小林弘祐：有効膜面積および中空糸内径の異なる PMMA 膜フィルタにおけるフィルタライフタイム評価。
人工臓器、44:25,2015.
- 1 3. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、栗原佳孝、池邊奈保子、阿部結美、平田恵一、山内芙美、谷林由美、山下明泰：前希釈 HDF におけるレプチンの除去動態について。
腎と透析、79 別冊 HDF 療法'15:106～107,2015.
- 1 4. 齋藤毅、細谷広海、櫻井健治、平田恵一、池邊奈保子、阿部結美、栗原佳孝、山内芙美、谷林由美、小久保謙一：前希釈と後希釈 on-line HDF の生体適合性の検討。
腎と透析、79 別冊 HDF 療法'15:103～105,2015.
- 1 5. 山内芙美、栗原佳孝、平田恵一、阿部重結美、池邊奈保子、細谷広海、谷林由美、齋藤毅、櫻井健治：前希釈 HDF におけるリンの除去量についての検討。
腎と透析、79 別冊 HDF 療法'15:101～102,2015.
- 1 6. 小久保謙一、栗原佳孝、小林こず恵、小林弘祐：後希釈 HDF と前希釈 HDF に求められるフィルタの要件。
腎と透析、79 別冊 HDF 療法'15:8～11,2015.
- 1 7. 栗原佳孝、小久保謙一、小林こず恵、後田洋輔、塚尾浩、柳沢雅彦、後藤順子、針井則一、森口武史、松田兼一、小林弘祐：細径化したファイバを用いたヘモフィルタの開発。
医工学治療、27:44～47,2015.
- 1 9. 栗原佳孝：Annual European Society for Artificial Organs (ESAO) Congress 参加印象記。
人工臓器、44:226～227,2015.
- 2 2. 小林こず恵、栗原佳孝、小久保謙一、小林弘祐：化学技術の医療への利用。
化学と教育、62:540～541,2014.
- 2 3. 栗原佳孝：臨床工学技士として大学院で何を学びたいか 研究に必要な能力を身に付ける。
Clinical Engineering、25:628～630,2014.
- 2 4. 小久保謙一、栗原佳孝、小林弘祐：透析療法のいろは- 特性から考える治療法の選択- 血液濾過。
Clinical Engineering、25:311-316,2014.
- 2 5. 小久保謙一、栗原佳孝、小林こず恵、森口武史、松田兼一、小林弘祐。細径化した中空糸膜を用いた血液浄化器の開発。
人工臓器、43:238～241,2014.
- 2 6. 塚尾浩、飯塚直人、栗原佳孝、小久保謙一、小林弘祐：ビタミン C の存在下では血液接触後のビタミン E 固定化透析膜の還元力が低下しない。
Vitamembrane 透析と活性酸素、14:29～34,2014.

27. 栗原佳孝、齋藤毅、櫻井健治、山内芙美、細谷広海、鈴木歩、谷林由美：PES 膜フィルタで生体不適合反応を示した 2 症例。
腎と透析、77 別冊 ハイパフォーマンスマンブレン'14:177~179,2014.
28. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、栗原佳孝、鈴木歩、山内芙美、谷林由美：日機装社製ヘモダイアフィルタ GDF の性能評価。
腎と透析、77 別冊 ハイパフォーマンスマンブレン'14:106~108,2014.
29. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、栗原佳孝、鈴木歩、山内芙美、谷林由美：HDF における蛋白結合性尿毒素の除去についての検討。
腎と透析、77 別冊 HDF 療法'14:140~142,2014.
30. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、栗原佳孝、丸山直子、鈴木歩、山内芙美、山下明泰：On-line HDF 時の血液流量・置換液量増加による透析効率への影響。
腎と透析、75 別冊 ハイパフォーマンスマンブレン'13:94~97,2013.
31. 細谷広海、齋藤毅、櫻井健治、栗原佳孝、丸山直子、朝日大樹、鈴木歩、山内芙美、谷林由美：On-line HDF における TDF-20H の性能評価。
腎と透析、75 別冊 HDF 療法'13:49~50,2013.
32. 朝日大樹、齋藤毅、櫻井健治、細谷広海、栗原佳孝、丸山直子、鈴木歩、山内芙美、谷林由美：On-line HDF における MFX-25Ueco の性能評価。
腎と透析、75 別冊 HDF 療法'13:77~79,2013.