

博士学位論文

「透析液から一酸化窒素を付加した
血液透析における血小板活性化の抑制」

浦邊 俊一郎 (DM13010)

令和2年度秋季

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

指導教員 久保田 勝 教授

小久保 謙一 准教授

小林 こず恵 助教

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。

要旨

【目的】

血液透析患者は動脈硬化などの血管障害が亢進していることが知られており、その原因として、血液が透析膜や血液回路と接触することによる血小板および白血球の活性化や酸化ストレスなどが考えられている。一方、生体内では血管内皮細胞の一酸化窒素合成酵素(eNOS)によって、一酸化窒素(NO)が常に放出されており、NO は血小板凝集抑制作用、単球の遊走抑制作用、好中球・単球の内皮付着抑制作用、LDL の酸化的修飾の抑制作用、平滑筋弛緩作用などを示すことが知られている。そこで NO を透析液側から付加することで、透析膜を通して血液に NO を付加し、血小板活性化などの血液透析療法における合併症を軽減できると考えた。本研究では、動物血を用いた *ex vivo* 実験において、透析膜と接触した血小板の活性化を抑制するかどうか明らかにすることを目的とした。

【方法】

本実験では、NO 付加群と Control 群の 2 群($n=4\sim6$)で行った。

実験① ブタ血液または多血小板血漿(PRP)をポリスルホン(PS)膜またはポリメチルメタクリレート(PMMA)膜の透析膜を用いて血液透析を 4 時間行った。NO 供与体であるニトロプルシドナトリウムを透析液に投与することで NO を付加した。ブタ血液を用いた実験では血小板凝集の程度の評価として血小板凝集能、血小板数を測定した。PRP を用いた実験では NO 作用の程度の評価として cGMP 量を測定した。

実験② ブタ血液または PRP を PS 膜の透析膜を用いて血液透析を 1 時間行った。NO ガスをガス交換器を用いて透析液に NO を付加した。ブタ血液を用いた実験では NO の副作用の程度をメトヘモグロビン(Met-Hb)濃度で測定した。PRP を用いた実験で、血小板の活性化を P-セレクチン発現率で測定した。

【結果】

実験① ブタ血液を用いた実験では、透析開始 30 分後と透析終了時の血小板凝集能は NO 付加群が Control 群と比べて、有意に低値を示した($p < 0.05$, $n=4$)。血小板数は、NO 付加群と Control 群で変化しなかった。PRP を用いた実験では、透析開始 30 分後と透析終了時の cGMP 量は NO 付加群が 372 ± 327 pmol であったのに対し、Control 群が 188 ± 331 (SD) pmol と有意に高値を示した($p < 0.05$, $n=6$)。

実験② ブタ血液を用いた実験では、NO 付加群の Met-Hb 濃度は循環実験中 2.5 % 未満で、Control 群と同程度だった。PRP を用いた実験では、P-セレクチン発現率は、Control 群では透析開始 5 分後に $12.80\pm4.55\%$ であり、透析開始前の $10.02\pm3.34\%$ から 30 % 有意に上昇していたのに対し($p < 0.05$, $n=5$)、NO 付加群では透析開始 5 分後に $13.71\pm7.38\%$ であり、透析開始前の $12.34\pm8.13\%$ から有意な上昇はみられなかった。

【考察】

実験①より血小板数に違いがなかったにもかかわらず、血小板凝集能が低下していたことから、透析液側から付加した NO が血小板の凝集を抑制したと考えられる。また、cGMP 量の増加が血小板凝集を抑制することを示しているため、NO を付加することで cGMP 量を増加させて血小板凝集を抑制したと考えられる。しかし、実験①で使用したニトロプルシドナトリウムは、半減期が 3～4 分であり、また、血管拡張薬として使用される薬で、血液透析患者に使用すると低血圧を引き起こす可能性がある。そこで実験②では、半減期が数秒の NO ガスを使用して透析液に NO を付加した。NO ガスを透析液に付加することで血中の Met-Hb 濃度は 2.5 %で、副作用の許容範囲の 10 %を下回ったので、NO ガスの副作用の危険性が低いことを示した。NO 付加群の P-セレクチンの発現の変化率が低値を示したので、NO ガスを用いた場合でも血小板の活性化を抑制することができると考えられる。

【結論】

動物血を用いた *ex vivo* 実験において、透析液側から血液に NO を付加し、透析膜と接触した血小板の活性化を抑制することができた。

目次

	頁
第 1 章 序論 -----	1
1.1 背景 -----	1
1.2 目的 -----	3
第 2 章 実験目的および方法 -----	4
2.1 ニトロプルシドナトリウムを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制--	4
2.1.1 目的 -----	4
2.1.2 使用機器 -----	4
2.1.3 実験準備 -----	6
2.1.4 実験方法 -----	7
2.2 NO ガスを透析液側に付加したときの透析液溶存 NO 濃度の測定-----	11
2.2.1 目的 -----	11
2.2.2 使用機器 -----	11
2.2.3 実験準備 -----	12
2.2.4 実験方法 -----	14
2.3 NO ガスを透析液側に付加し、透析液を循環させた場合の溶存 NO 濃度の測定	16
2.3.1 目的 -----	16
2.3.2 使用機器 -----	16
2.3.3 実験準備 -----	17
2.3.4 実験方法 -----	18
2.4 NO ガスを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制 -----	20
2.4.1 目的 -----	20
2.4.2 使用機器 -----	20
2.4.3 実験準備 -----	21
2.4.4 実験方法 -----	23
2.5 NO ガスを透析液側に付加したときの Met-Hb 濃度測定 -----	26
2.5.1 目的 -----	26
2.5.2 使用機器 -----	26
2.5.3 実験準備 -----	27
2.5.4 実験方法 -----	29

第3章 結果	31
3.1 ニトロプルシドナトリウムを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制--	31
3.1.1 血小板凝集能の測定	31
3.1.2 血小板数の測定	33
3.1.3 血小板中 cGMP 量の測定	34
3.2 NO ガスを透析液側に付加したときの溶存 NO 濃度の測定	36
3.3 NO ガスを透析液側に付加し、透析液を循環させた場合の溶存 NO 濃度の測定	37
3.4 NO ガスを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制	39
3.5 NO ガスを透析液側に付加したときの Met-Hb 濃度測定	41
第4章 考察	42
4.1 ニトロプルシドナトリウムを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制--	42
4.1.1 血小板凝集の測定	42
4.1.2 血小板数の測定	42
4.1.3 血小板中 cGMP 量の測定	43
4.1.4 膜素材の違いについて	44
4.1.5 ニトロプルシドナトリウムについて	44
4.1.6 まとめ	44
4.2 NO ガスを透析液側に付加したときの溶存 NO 濃度の測定	45
4.3 NO ガスを透析液側に付加し、透析液を循環させた場合の溶存 NO 濃度の測定 -	45
4.4 NO ガスを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制	46
4.5 NO ガスを透析液側に付加したときの Met-Hb 濃度測定	47
4.6 今後の課題	48
第6章 結語	49
謝辞	50
参考文献	51

第1章 序論

1.1 背景

血液透析療法は末期腎不全患者の生命維持に必要不可欠である。しかし、血液透析治療は、それ自体が酸化ストレス¹⁾と血小板活性化^{2,3)}を引き起こし、動脈硬化や冠動脈疾患^{4,5)}を含む血管障害のリスクと関連していることはよく知られている。血液透析治療を受けている患者は血小板反応性が増加することも知られており⁶⁾、これは冠動脈疾患の発生率と正の相関があると報告されている^{4,7,8)}。血液透析治療において、血小板を活性化する刺激として透析膜との接触、血液回路との接触、抗凝固剤としてのヘパリンの使用が考えられている。血小板が活性化を起こすと、他の血小板膜糖蛋白 GP IIb/IIIa 複合体が血小板膜上に露呈される。露呈した GP IIb/IIIa 複合体にフィブリノゲンが結合する⁹⁾が、フィブリノゲン 1 分子は二量体であるため、一对の結合部位で血小板同士を橋渡しすることになり、血小板の凝集が起こる。露呈した GP IIb/IIIa 複合体には von Willebrand 因子も結合し、血小板の粘着は促進する。こうして血小板の粘着反応は増幅され、凝集へと進行する。

これらを抑制するために、透析膜の素材や構造、膜表面の均一化などの改良が日々加えられており、生体適合性は向上しているものの¹⁰⁾、血液が透析膜を異物と認識している限り、これらの症状をなくすことは困難である。

一方、生体内では、血管内皮細胞の細胞膜に発現する一酸化窒素合成酵素(NOS)の産生した一酸化窒素(NO)が血小板凝集抑制作用を示していることが知られている¹¹⁻¹³⁾。NO は遷移金属イオンに対する親和性が非常に高く、さまざまな遷移金属錯体と強固な配位結合を形成する。特に、2 価(還元型)5 配位型のヘムと結合する能力は O₂ や CO などよりはるかに大きい。グアニル酸シクラーゼは休止状態で 2 価のヘム鉄を有し、それが NO と結合することによりヘム鉄とアポ酵素の結合が切れ、5 配位のニトロシルヘムとなる。その結果グアニル酸シクラーゼが活性化して cGMP 量が上昇し、細胞内のカルシウム (Ca²⁺) の流入を抑制することで血小板凝集を抑制する¹⁴⁾。また、他の経路を介して抑制するといった報告もある¹⁵⁾。NO は血小板凝集抑制作用以外にも、内皮細胞由来血管弛緩因子(EDRF)としての作用、神経伝達物質としての作用、免疫防御作用、白血球活性化抑制作用、スーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)消去・産生抑制作用などの多くの生理作用を持つ。

NO は O₂ やほかの活性酸素と反応してさまざまな窒素酸化物を形成する。そのため NO の副作用として、NO の 2 次産物による作用も考える必要がある。たとえば、NO と O₂ との反応によって生じる NO₂ は、水と反応して強酸となり脂質過酸化を引き起こす。また、血管内皮細胞やマクロファージなど NO とスーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)が同時に発生する場では、NO と $\cdot\text{O}_2^-$ は速やかに反応してパーオキシナイトライト(ONOO⁻)を生成する¹⁶⁾。ONOO⁻ は強力な酸化剤であり、生体内では SH 基などを酸化する。

またこれにプロトンが付加した ONOOH は、硝酸に異化する過程でヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)と同程度の反応性をもつ活性化状態を経由するため、脂質過酸化を引き起こす。さらに ONOO $^-$ はスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)をはじめとする遷移金属イオンの存在下で NO $_2^+$ (ニトロニウムイオン)を生成するが¹⁷⁾、これは強力なニトロ化作用を有し、チロシンなどの芳香族アミノ酸残基を攻撃する。

メトヘモグロビン(methemoglobin ; Met-Hb)は NO または NO $_2^-$ が結合しヘモグロビンの鉄が 2 価(Fe^{2+})から 3 価(Fe^{3+})の状態になったもので、暗赤褐色の独特の色調を示す¹⁸⁾。NO と、ヘモグロビンの Fe^{2+} との親和性は、一酸化炭素の 1400 倍あるといわれている。薬物や化学物質が直接的に、あるいは酸素分子による酸化を間接的に促進して、メトヘモグロビン血症が発生する。Met-Hb は正常人のヘモグロビン中にも常時生成されているが、赤血球内の還元酵素(Met-Hb reductase、G6PD)で常に還元されており、正常人の血中には 1 %前後検出されるに過ぎない。重症の急性メトヘモグロビン血症では酸素運搬が障害され、ヘモグロビンの 60~70 %を超えるメトヘモグロビン血症は致死的である。慢性のメトヘモグロビン血症では、通常は症状がない。ただし、20 %以上を Met-Hb が占めるようになると、軽度の赤血球増加症が出現する。成人において Met-Hb 量が上昇すると種々の症状があらわれる(表 1)。

以上のことを踏まえると、透析膜表面が血管内皮細胞のように NO を放出すれば、血小板をはじめとする血液成分が透析膜を異物と認識せず、酸化ストレスや活性化を抑えることができるのではないかと考えた。本研究では、特に NO による血小板凝集抑制作用に注目し、さらに NO による副作用の有無についても検討を行った。

表 1. 血中の Met-Hb 濃度と症状

Met-Hb 濃度	症状
< 10%	無症状
10~25%	チアノーゼが現れるがほとんど無症状
25~35%	チアノーゼが著明になる
35~40%	運動により頭痛、めまい、疲労、呼吸困難、頻脈など
40% ≤	酸素欠乏症
50~60%	意識喪失、痙攣
60~75% ≤	昏睡状態で生命の危険を招く

1.2 目的

動物血を用いた *ex vivo* 実験において、透析液に付加した NO が透析膜と接触した際の血小板の活性化を抑制するかどうか明らかにすることを目的とした。

第2章 実験目的および方法

2.1 ニトロプルシドナトリウムを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制

2.1.1 目的

ブタ血液を用いた透析循環回路を用いて、NO 供与体であるニトロプルシドナトリウムを透析液側に投与することで、透析液に放出される NO による循環血液の血小板活性化の抑制効果を検討した。

2.1.2 使用機器

1) 実験系

- ・ブタ血液 3 L
- ・5 L ビーカー
- ・2 L ビーカー
- ・ペニシリン・ストレプトマイシン
invitrogen™ (GIBCO Penicillin Streptomycin)
- ・生理食塩液 (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 (味の素株式会社)
- ・5%ブドウ糖注射液 (大塚製薬株式会社)
- ・ニトロプルシドナトリウム (Wako 社)
- ・透析剤 カーボスター (味の素株式会社)
- ・コンソール DCS-26 (日機装株式会社)
- ・デジタルポンプ MASTERFLEXR L/S (Cole-Parmer Instrument Company)
- ・シリンジポンプ 1235N (ATOM 社)
- ・ダイアライザ
ポリスルホン (PS)膜 TS1.6UL (東レ・メディカル株式会社、表 2.1)
ポリメチルメタクリレート (PMMA)膜 BG1.6PQ (東レ・メディカル株式会社、表 2.1)
- ・血液回路 (日機装株式会社)
- ・腹水濾過濃縮用血液回路 FCB-03 (旭化成クラレメディカル株式会社)
- ・恒温器 TR-1A (アズワン株式会社)
- ・遠心分離器 MCX-150
- ・混ぜ棒
- ・はさみ
- ・鉗子
- ・18G 注射針 (テルモ株式会社)

表 2.1 使用したダイアライザの仕様

ダイアライザ	TS-1.6UL	BG-1.6PQ
膜素材	ポリスルホン	ポリメチルメタクリレート
中空糸内径 (μm)	200	200
膜厚 (μm)	40	30
有効長 (mm)	257	195

2) 測定系

- ・動物用全自動血球計数器 Celltac α MEK-6450 (日本光電工業株式会社)
- ・血小板凝集測定装置 全血式カルナ (アイ・エム・アイ株式会社)
- ・マイクロプレートリーダー Model 680
(日本バイオラッド・ラボラトリーズ株式会社)
- ・cyclic GMP Complete kit (assay designs 社)
- ・遠心分離器 LC-230 (トミー精工)
- ・アデノシン二リン酸(ADP)試薬 (アイ・エム・アイ株式会社)
- ・コラーゲン試薬 (アイ・エム・アイ株式会社)
- ・9 mM EDTA-PBS 溶液
- ・0.5 mM EDTA-PBS 溶液
- ・3.2%クエン酸ナトリウム溶液
- ・0.1 M 塩酸 (Wako 社)
- ・Triton-X100 (Wako 社)
- ・マイクロピペット PIPETMAN (GILSON 社)
- ・ピペットチップ (ビーエム機器株式会社)
- ・マイクロチューブ (トレフラボ社)
- ・遠沈管 (CELLSTAR 社)
- ・シリンジ (テルモ株式会社)
- ・ラウンドチューブ (FALCON 社)

2.1.3 実験準備

1) 血液側

ブタ血液の調製

ブタ血液は当日採取されたものを使用した。実験当日、東京芝浦臓器株式会社（東京都品川区）より入手。保冷剤入りのクーラーボックスへ保管し、刺激を与えないよう慎重に研究室まで輸送した。ブタ血液には終濃度 10 mM のクエン酸ナトリウムが添加されていた。ブタ血液 3 L をビーカーに移し、ペニシリン・ストレプトマイシン合剤ペニシリンを 30 mL 投与した（終濃度：ペニシリン 100,000 Units/L、ストレプトマイシン 100,000 μ g/L）。

多血小板血漿 (PRP) の調製

多血小板血漿 (PRP) は全血を遠心分離することによって調整した血小板に富む血漿濃縮物である。血小板の反応を鋭敏にとらえたい場合や、全血から血小板を分離する際の検体処理に時間がかかり、評価が困難な場合に使用した。PRP の調製は、Tsukao らの論文をもとに作成した²⁰⁾。ブタ血液 3 L を 140G で 20 分遠心分離したものの血漿部分を採取し PRP として使用した。

2) 透析液側

透析液は、カーボスターB 剤 1 溶に対して RO 水 26 溶を加えて希釈し、この希釈液 34 溶に対して A 剤 1 溶を加えて 5 L 作製した。透析液側は閉回路とし、デジタルポンプによって循環させた（図 2.1）。

また NO 付加群においては、5%ブドウ糖注射液で希釈した 0.1 mM のニトロプルシドナトリウムを 100 μ L/min でシリンジポンプを使用して透析液回路へ持続投与することで NO を付加した。また、何も投与しない群を Control 群とした。

3) プライミング

本研究の実験回路の血液側は血液回路、ダイアライザ、腹水濾過濃縮用血液回路で構成され、血液回路の動脈側と静脈側を腹水濾過濃縮用血液回路に接続することで、血液は血液回路、ダイアライザを循環する方法とした。血液回路とダイアライザは、終濃度 10 μ g/L となるようにメシル酸ナファモスタットを加えた生理食塩液でプライミングを行った。透析液側は透析液でプライミングを行った。

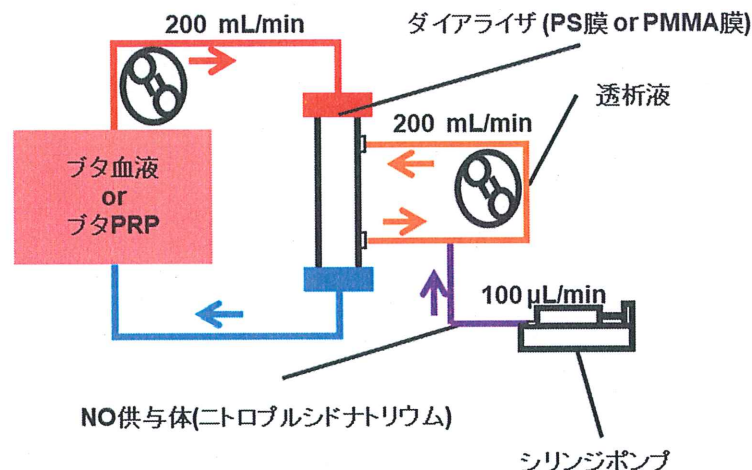


図 2.1 実験 2.1 回路

2.1.4 実験方法

1) 実験条件

PS 膜ダイアライザ TS1.6UL または PMMA 膜ダイアライザ BG-1.6PQ を使用した (表 2.1)。PS 膜ダイアライザは血液透析治療において一般に使用される素材のダイアライザである。一方、PMMA 膜ダイアライザは吸着特性を有する膜である。透析膜ブタ血液 1 L または PRP600 mL を血液回路、ダイアライザに充填されていた生理食塩液から置換し、残りのブタ血液または PRP は腹水濾過濃縮用血液回路へ充填された。血液側、透析液側ともに流量 200 mL/min で並流に循環させた。ブタ血液を血液回路、ダイアライザ、腹水濾過濃縮用血液回路へ充填させてすぐに透析液を循環させると血液凝固が頻繁に発生したため、最初の 1 時間は透析液を循環させず血液側のみを循環させ、その後透析液を循環させ血液透析を行った。透析時間は 4 時間とした。実験中腹水濾過濃縮用血液回路は 37℃の恒温槽に入れて加温した。ブタ血液を用いた実験では血小板凝集の程度の評価として血小板凝集能、血小板数を測定した。PRP を用いた実験では NO 作用の程度の評価として cGMP 量を測定した。血小板凝集能の測定のために、血液循環を開始する前の血液(-60 分)と血液循環開始 30 分後(-30 分)、血液透析を開始する前の血液(血液透析開始前)と、血液透析開始 30 分後、240 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから血液のサンプリングを行った (図 2.2)。血小板数の測定のために、血液循環を開始する前の血液(-60 分)と血液循環開始 30 分後(-30 分)、血液透析を開始する前の血液(0 分)、血液透析開始 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後、180 分後、240 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから血液のサンプリングを行った。血小板中 cGMP 量の測定のために、血液透析を開始する前の血液(0 分)、血液透析開始 30 分後、240 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから PRP のサンプリングを行った。

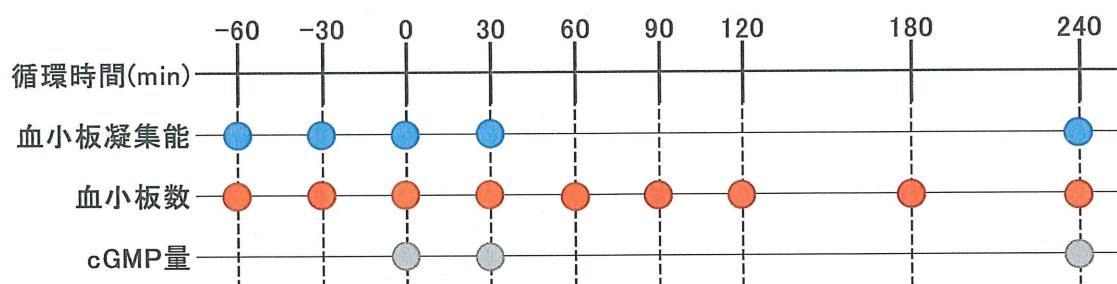


図 2.2 実験 2.1 スケジュール

2) 血小板凝集能の測定

血液循環を開始する前の血液(-60 分)と血液循環開始 30 分後(-30 分)、血液透析を開始する前の血液(血液透析開始前)と、血液透析開始 30 分後、240 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから血液のサンプリングを行い、screen filtration pressure 法を測定原理とした血小板凝集能測定装置を使用して血小板凝集能を測定した。本研究では、血小板の凝集能を測定するために、WBA-Carna を用いて測定した(図 2.3)。定量全血検体に血小板凝集惹起物質を添加し、一定時間攪拌した後、マイクロメッシュフィルタ ($20 \times 20 \mu\text{m}$) を通して吸引動作を行う測定方法である(図 2.4)。検体 1 mL をスターラーの入った 4 本のチューブに $200 \mu\text{L}$ ずつ分注し、 37°C の恒温槽を含む装置に設置し、1 分攪拌を行った。その後、凝固促進剤である ADP またはコラーゲンを、濃度を変えて 4 本のチューブにそれぞれ添加した。5 分間の反応時間を経て、検体は装置によって マイクロメッシュフィルタを含むチューブを通して吸引され、その際の吸引圧力を測定、フィルターが完全閉塞したときの圧力を 100% とし、血小板凝集能を測定した(図 2.5)。



図 2.3 WBA カルナ装置外観

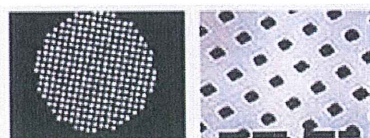


図 2.4 マイクロメッシュフィルタ

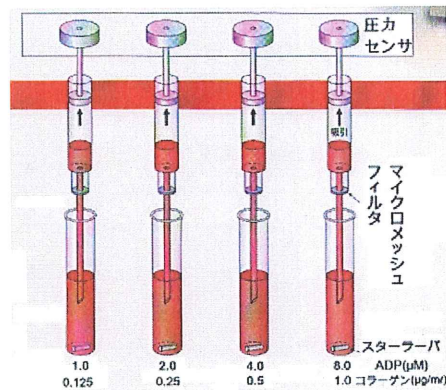


図 2.5 WBA カルナ測定方法

【TAIYO血小板凝集能測定装置 SFP 法 WBA CARNA】

<https://jaclas.or.jp/Product/index?id=102176#functions> より引用 (最終閲覧日 2020 年 8 月 28 日)

3) 血小板数の測定

血液循環を開始する前の血液(-60 分)と血液循環開始 30 分後(-30 分)、血液透析を開始する前の血液(0 分)、血液透析開始 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後、180 分後、240 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから血液のサンプリングを行い、全自動血球計数器を使用して以下の手順で血小板数を測定した。

- ① サンプリングした血液 2 mL をラウンドチューブに入れた。
- ② ラウンドチューブに、抗凝固薬として 0.5 mM の EDTA 溶液 2 mL を加えて軽く転倒混和した。
- ③ 全自動血球計数器によって血小板数を測定した。

4) 血小板中 cGMP 量の測定

血液透析を開始する前の血液(0 分)、血液透析開始 30 分後、240 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから PRP のサンプリングを行い、以下の手順で血小板中 cGMP 量を測定した。

- ① サンプリングした PRP 1 mL をマイクロチューブに入れた。
- ② 0.1 M 塩酸溶液に Triton-X100 が 0.1%になるように溶解した液を 1 mL 入れた。
- ③ 回転数 15000 rpm で 2 分間遠心分離した。
- ④ cyclic GMP Complete kit を用いて ELISA 法で測定した。

5) 統計処理

2)、3)、4)で得た結果を、統計解析ソフト FreeJSTAT ver.12.5 を用いて解析した。以下の表のように設定を行い、血小板凝集能の場合は NO の有無と血小板凝集惹起物質の濃度を因子とし、血小板数の場合は NO の有無と血液透析時間を因子とし、二元配置を行った(表 2.2)。検定は二元配置分散分析を行い、有意差を検討した。 p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

表 2.2 二元配置分散分析におけるデータ設定
血小板凝集能

	1 0.0125	2 0.25	4 0.5	8 1	ADP(μ M) コラーゲン(μ g/L)
Control 群	A1	A2	A3	A4	
NO 付加群	B1	B2	B3	B4	

血小板数

	30min	60min	90min	120min	180min	240min
Control 群	C1	C2	C3	C4	C5	C6
NO 付加群	D1	D2	D3	D4	D5	D6

2.2 NO ガスを透析液側に付加したときの透析液溶存 NO 濃度の測定

2.2.1 目的

透析液に NO ガスを付加したときに、透析液中に NO が溶存していることを確認することを目的とした。

2.2.2 使用機器

1) 実験系

- ・ブタ血液 3 L
- ・5 L ビーカー
- ・ペニシリン・ストレプトマイシン
invitrogen™ (GIBCO Penicillin Streptomycin)
- ・生理食塩液 (大塚製薬株式会社)
- ・クエン酸三ナトリウム二水和物 (Wako 社)
- ・メシル酸ナファモスタット コアヒビター (味の素株式会社)
- ・5%ブドウ糖注射液 (大塚製薬株式会社)
- ・RO 水 90 L
- ・透析剤 カーボスター (味の素株式会社)
- ・コンソール DCS-26 (日機装株式会社)
- ・遠心ポンプ PMD-331B7C (三相電機株式会社)
- ・人工肺
クアドロックス膜型人工肺 (コスモテック株式会社)
VPCML PLUS (COBE Cardiovascular, Inc.)
- ・NO ガスボンベ (NO : 800 ppm、N₂ : Balance) (高千穂化学工業株式会社)
- ・N₂ ガスボンベ (株式会社イワサワ)
- ・O₂ ガスボンベ (株式会社イワサワ)
- ・CO₂ ガスボンベ (株式会社イワサワ)
- ・圧力調整器 CROWN (株式会社ユタカ)
- ・流量調整器 RK-1250 (コフロック株式会社)
- ・PS 膜ダイアライザ TS1.6UL (東レ・メディカル株式会社)
- ・血液回路 シュアフロー (ニプロ株式会社)
- ・腹水濾過濃縮用血液回路 FCB-03 (旭化成クラレメディカル株式会社)
- ・攪拌機 ROCKING MIXER RM-300 (アズワン株式会社)
- ・恒温器 TR-1A (アズワン株式会社)
- ・遠心分離器 MCX-150 (株式会社トミー精工)
- ・遠心分離器 LC-230 (株式会社トミー精工)
- ・混ぜ棒

- ・はさみ
- ・鉗子
- ・18G 注射針 (テルモ株式会社)

2) 測定系

- ・遠心分離器 LC-230 (株式会社トミー精工)
- ・遠心分離器 MCX-150 (株式会社トミー精工)
- ・VORTEX GENIE 2 (Scientific Industries)
- ・プレートミキサー OPM-103 (アズワン株式会社)
- ・マイクロプレートリーダー Model 680
(日本バイオラッド・ラボラトリーズ株式会社)
- ・遠心式フィルターユニット マイクロコン YM-100 (日本ミリポア株式会社)
- ・EDTA(エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物) (SIGMA 社)
- ・NO₂ / NO₃ Assay Kit-C II (Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~
(株式会社同仁化学研究所)
- ・マイクロピペット PIPETMAN (GILSON 社)
- ・ピペットチップ (ビーエム機器株式会社)
- ・マイクロチューブ (トレフラボ社)
- ・遠沈管 (CELLSTAR 社)
- ・シリンジ (テルモ株式会社)

2.2.3 実験準備

1) 血液側

ブタ血液の調製

2.1.3 と同様の処理を行った。

2) 透析液側

透析液は、カーボスターB 剤 1 溶に対して RO 水 26 溶を加えて希釈し、この希釈液 34 溶に対して A 剤 1 溶を加えて 90 L 作製した。作製した透析液 90 L にクエン酸三ナトリウム二水和物を 113.18 g を加えた(終濃度 4.0 mM)。

また、ダイアライザ手前の透析液供給ラインに人工肺を接続し、NO ガスを付加しない群を Control 群、NO ガスを付加する群を NO 付加群として、人工肺の血液側に透析液、ガス側に濃度を調節した混合ガスを流量 200 mL/min で吹送した。ガス濃度は、流量を流量計によって調整した(表 2.3、図 2.6)。

透析患者の多くはバスキュラーアクセスとしてあらかじめ動静脈を吻合・短絡させた内シャントを用いているため、血液としては動静脈混合血が流れており、ヘモグロビン酸素飽和度は 60～80%である²¹⁾。このときの酸素分圧は酸素解離曲線から 40～50 mmHg となり、付加する O₂ ガスの割合はドルトンの分圧の法則から 6 % とした。同様に、二酸化炭素分圧は約 40 mmHg であることから、付加する CO₂ ガスの割合は 5 % とした。

表 2.3 混合ガスの組成

Control 群(NO 非付加)	NO 付加群(NO 付加)
O ₂ ガス : 6 % (30 mL/min)	O ₂ ガス : 6 % (30 mL/min)
CO ₂ ガス : 5 % (25 mL/min)	CO ₂ ガス : 5 % (25 mL/min)
N ₂ ガス : 89 % (445 mL/min)	NO ガス : 792 ppm (445 mL/min)

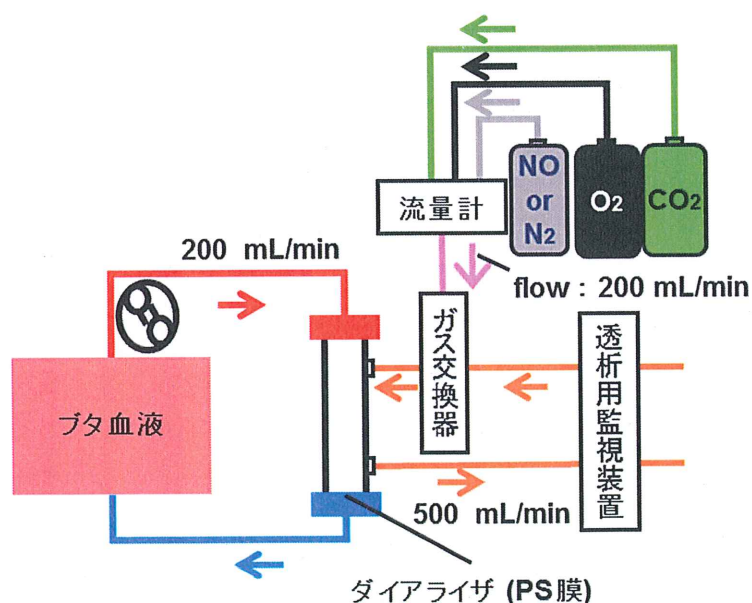


図 2.6 実験 2.2 回路

3) プライミング

本研究の実験回路の血液側は血液回路、ダイアライザ、腹水濾過濃縮用血液回路で構成され、血液回路の動脈側と静脈側を腹水濾過濃縮用血液回路に接続することで、血液は血液回路、ダイアライザを循環する方法とした。血液回路とダイアライザは、生理食塩液でプライミングを行った。透析液側は透析液でプライミングを行った。

2.2.4 実験方法

1) 実験条件

Control 群、NO 付加群の 2 つの条件について、ブタ血液を流量 200 mL/min でダイアライザに循環させ、透析液流量 500 mL/min、ガス流量 200 mL/min で並流操作にて血液透析を行った。実験中、腹水濾過濃縮用血液回路は 37℃の恒温槽で加温し、攪拌機で腹水濾過濃縮用血液回路中の血液を攪拌した。血液回路と腹水濾過濃縮用血液回路は、ブドウ糖注射液 19 mL にメシル酸ナファモスタットを 10 mg 加えた液を 5 mL/hr で投与した。透析時間は 60 分とした。

2) サンプル採取と処理方法

血液透析を開始する前の循環血液（血液透析開始前）と透析開始 5 分後、30 分後、60 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから血液 5 mL のサンプリングを行った。血清をサンプルとして測定するには除タンパクが必要なため、以下の手順で除タンパクを行った。

- ① 遠沈管にサンプリングした血液 5 mL を入れ、3000 rpm で 10 分間遠心分離をした。
- ② 血清 500 μ L を採取してマイクロコンに入れ、14000G (13200 rpm) で 10 分間遠心濾過し除タンパクを行った。

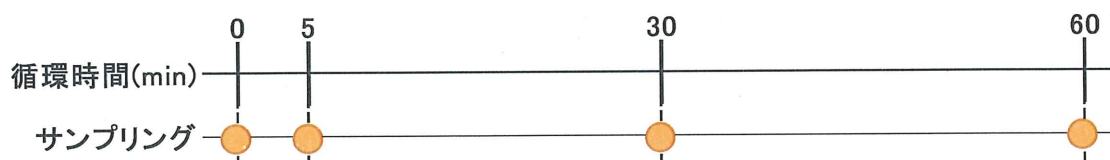


図 2.7 実験 2.2 スケジュール

3) NO_2^- , NO_3^- 濃度の測定¹⁹⁾

NO の代謝産物である NO_2^- と NO_3^- の濃度を Griess 法によって測定し、間接的に NO 濃度を測定した。

- ① 除タンパクを行った血清サンプルを 96 穴プレートの各 well に分注した。
- ② 各 well に還元酵素溶液を 10 μL 加えた。
- ③ 各 well に補酵素溶液を 10 μL 加え、プレートミキサー上で室温 (約 25°C) にて 2 時間インキュベートした。
- ④ 各 well に試薬 A (スルファニルアミド、リン酸を含む) を 50 μL 加え、5 分間インキュベートした。
- ⑤ 各 well に試薬 B (1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩、水を含む) を 50 μL 加え、10 分間インキュベートした。
- ⑥ マイクロプレートリーダーで波長 540 nm における吸光度を測定した。

- ・ はさみ
- ・ 鉗子
- ・ 18G 注射針 (テルモ株式会社)

2) 測定系

- ・ 遠心分離器 LC-230 (株式会社トミー精工)
- ・ 遠心分離器 MCX-150 (株式会社トミー精工)
- ・ VORTEX GENIE 2 (Scientific Industries)
- ・ プレートミキサー OPM-103 (アズワン株式会社)
- ・ マイクロプレートリーダー Model 680
(日本バイオラッド・ラボラトリーズ株式会社)
- ・ 遠心濾過デバイス NANOSEP 10K OMEGA
(日本ポール株式会社)
- ・ NO₂ / NO₃ Assay Kit-C II (Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~
(株式会社同仁化学研究所)
- ・ EDTA(エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物)(SIGMA 社)
- ・ マイクロピペット PIPETMAN (GILSON 社)
- ・ ピペットチップ (ビーエム機器株式会社)
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ (トレフラボ社)
- ・ 遠沈管 (CELLSTAR 社)
- ・ シリンジ (テルモ株式会社)
- ・ ストップウォッチ

2.3.3 実験準備

1) 血液側

ブタ血液の調製

2.1.3 と同様の処理を行った。

2) 透析液側

透析液は、カーボスターB 剤 1 溶に対して RO 水 26 溶を加えて希釈し、この希釈液 34 溶に対して A 剤 1 溶を加えて 5 L 作製した。透析液側は閉回路とし、デジタルポンプによって循環させた。透析液出口側には三方活栓を接続しダイアライザを通った透析液をサンプリングできるようにした。

また、ダイアライザ手前の透析液供給ラインに人工肺を接続した。NO ガスを付加しない群を Control 群、NO ガスを付加する群を NO 付加群として、人工肺の血液側に透析液、ガス側に濃度を調節した混合ガスを流量 500 mL/min で吸送した。ガス濃度は、流量を流量計によって調節することで調整した(表 2.3、図 2.8)。

3) プライミング

本研究の実験回路の血液側は血液回路、ダイアライザ、腹水濾過濃縮用血液回路で構成され、血液回路の動脈側と静脈側を腹水濾過濃縮用血液回路に接続することで、血液は血液回路、ダイアライザを循環する方法とした。血液回路とダイアライザは、生理食塩液でプライミングを行った。透析液側は透析液でプライミングを行った。

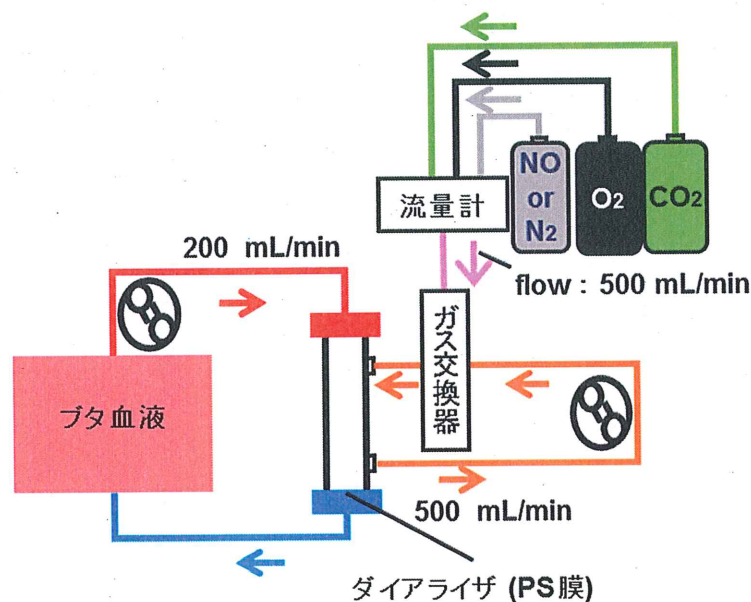


図 2.8 実験 2.3 回路

2.3.4 実験方法

1) 実験条件

Control 群、NO 付加群の 2 つの条件について、ブタ血液を流量 200 mL/min でダイアライザに循環させ、透析液流量 500 mL/min、ガス流量 500 mL/min で並流操作にて血液透析を行った。実験中、腹水濾過濃縮用血液回路は 37℃の恒温槽で加温し、攪拌機で腹水濾過濃縮用血液回路中の血液を攪拌した。血液回路と腹水濾過濃縮用血液回路は、ブドウ糖注射液 19 mL にメシル酸ナファモスタットを 10 mg 加えた液を 5 mL/hr で投与した。透析時間は 4 時間とした。

2) サンプル採取と処理方法

血液透析開始 5 分後、30 分後、60 分後、240 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから血液 5 mL、透析液出口側の三方活栓から透析液 1.5 mL のサンプリングを行った。

A) 血液

- ① あらかじめ EDTA を 5 mg 入れた遠沈管にサンプリングした血液 5 mL を入れ転倒混和した。3000 rpm で 10 分遠心分離をした。
- ② 血清 400 μ L をナノセップに入れ、14000 G (13200 rpm) で 20 分遠心濾過し、除タンパクを行った。

B) 透析液

- ① マイクロチューブにサンプリングした透析液 1.5 mL を入れ転倒混和した。

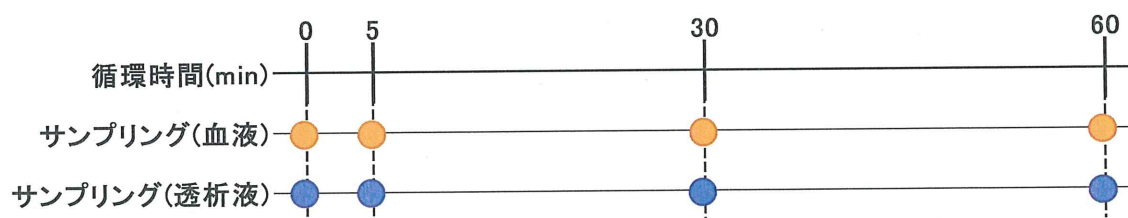


図 2.9 実験 2.3 スケジュール

3) NO_2^- , NO_3^- 濃度の測定

血液と透析液中の NO_2^- と NO_3^- の濃度を 2.2.4 と同様に測定した。

2.4 NO ガスを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制

2.4.1 目的

NO ガスを透析液に付加した場合と NO ガスを付加しなかった場合の血小板の P-セレクチン発現率を測定し、血小板の活性化で比較検討した。

2.4.2 使用機器

1) 実験系

- ・ ブタ血液 3 L
- ・ 5 L ビーカー
- ・ 2 L ビーカー
- ・ ペニシリン・ストレプトマイシン
invitrogen™ (GIBCO Penicillin Streptomycin)
- ・ 生理食塩液 (大塚製薬株式会社)
- ・ クエン酸三ナトリウム二水和物 (Wako 社)
- ・ メシル酸ナファモスタット コアヒビター (味の素株式会社)
- ・ 5%ブドウ糖注射液 (大塚製薬株式会社)
- ・ RO 水 90 L
- ・ 透析剤カーボスター (味の素株式会社)
- ・ コンソール DCS-26 (日機装株式会社)
- ・ 遠心ポンプ PMD-331B7C (三相電気株式会社)
- ・ 人工肺
クアドロックス膜型人工肺 (コスモテック株式会社)
VPCML PLUS (COBE Cardiovascular, Inc.)
- ・ NO ガスボンベ (NO : 800 ppm、N₂ : Balance) (高千穂化学工業株式会社)
- ・ N₂ ガスボンベ (株式会社イワサワ)
- ・ O₂ ガスボンベ (株式会社イワサワ)
- ・ CO₂ ガスボンベ (株式会社イワサワ)
- ・ 圧力調整器 CROWN (株式会社ユタカ)
- ・ 流量調整器 RK-1250 (コフロック株式会社)
- ・ PS 膜ダイアライザ TS1.6UL (東レ・メディカル株式会社)
- ・ 血液回路 シュアフロー (ニプロ株式会社)
- ・ 腹水濾過濃縮用血液回路 FCB-03 (旭化成クラレメディカル株式会社)
- ・ 攪拌機 ROCKING MIXER RM-300 (アズワン株式会社)
- ・ デジタルポンプ MASTERFLEXR L/S (Cole-Parmer Instrument Company)
- ・ 恒温器 TR-1A (アズワン株式会社)
- ・ 250 mL ボトル

- ・ 混ぜ棒
- ・ はさみ
- ・ 鉗子
- ・ 18G 注射針 (テルモ株式会社)

2) 測定系

- ・ 遠心分離器 LC-230 (株式会社トミー精工)
- ・ 遠心分離器 MCX-150 (株式会社トミー精工)
- ・ VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries)
- ・ フローサイトメーター : FACSCalibur™ (Becton Dickinson)
- ・ リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (和光純薬工業株式会社)
- ・ リン酸水素二ナトリウム・十二水 (和光純薬工業株式会社)
- ・ EDTA(エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物) (SIGMA 社)
- ・ ミリ-Q
- ・ 抗 P-セレクトリン抗体(CD62PE) sc-101619 (SANTA CRUZ Biotechnology)
- ・ 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (Wako 社)
- ・ マイクロピペット PIPETMAN (GILSON 社)
- ・ ピペットチップ (ビーエム機器株式会社)
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ (トレフラボ社)
- ・ マイクロチューブ (FALCON 社)
- ・ シリンジ (テルモ株式会社)
- ・ ストップウォッチ

2.4.3 実験準備

1) 血液側

ブタ血液の調製

2.1.3 と同様の処理を行った。

PRP の調製

2.1.3 と同様の処理を行った。

2) 透析液側

透析液は、カーボスターB 剤1 溶に対して RO 水 26 溶を加えて希釈し、この希釈液 34 溶に対して A 剤 1 溶を加えて 90 L 作製した。作製した透析液 90 L にクエン酸三ナトリウム二水和物を 113.18 g を加えた(終濃度 4.0 mM)。

また、ダイアライザ手前の透析液供給ラインに人工肺を接続した。NO ガスを付加しない群を Control 群、NO ガスを付加する群を NO 付加群として、人工肺の血液側に透析液、ガス側に濃度を調節した混合ガスを流量 500 mL/min で吹送した。ガス濃度は、流量を流量計によって調節することで調整した(表 2.3、図 2.10)。

3) プライミング

本研究の実験回路の血液側は血液回路、ダイアライザ、腹水濾過濃縮用血液回路で構成され、血液回路の動脈側と静脈側を腹水濾過濃縮用血液回路に接続することで、血液は血液回路、ダイアライザを循環する方法とした。血液回路とダイアライザは、生理食塩液でプライミングを行った。透析液側は透析液でプライミングを行った。

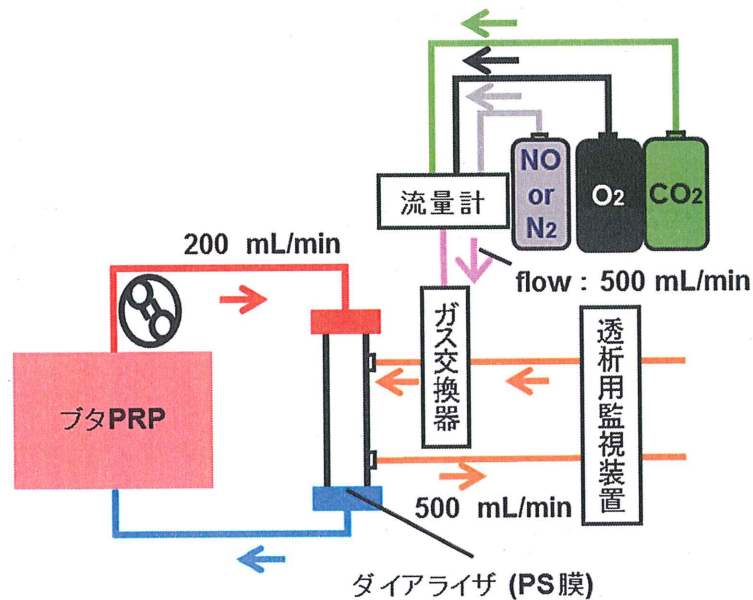


図 2.10 実験 2.4 回路

4) 試薬準備

1. 0.1 M リン酸緩衝液 PBS (pH 7.4)

表 2.4 の各試薬を純水に溶かして作製した。作製したものを遠沈管に入れ、冷蔵保管した。

表 2.4 リン酸緩衝液分量

0.1 M PBS (pH 7.4)	1 L
純水	968 g
リン酸二水素ナトリウム・二水和物	2.964 g
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物	29.009 g

2. 9 mM EDTA-PBS

表 2.5 の試薬を PBS に溶かして作製した。作製したものを遠沈管に入れ、冷蔵保管した。

表 2.5 EDTA-PBS 分量

EDTA-PBS	50 mL
0.1 M PBS (pH 7.4)	50 mL
EDTA	0.1675 g

2.4.4 実験方法

1) 実験条件

Control 群、NO 付加群の 2 つの条件について、PRP を流量 200 mL/min でダイアライザに循環させ、透析液流量 500 mL/min、ガス流量 500 mL/min で並流操作にて血液透析を行った。実験中、腹水濾過濃縮用血液回路は 37℃の恒温槽で加温し、攪拌機で腹水濾過濃縮用血液回路中の血液を攪拌した。血液回路と腹水濾過濃縮用血液回路は、ブドウ糖注射液 19 mL にメシル酸ナファモスタットを 10 mg 加えた液を 5 mL/hr で投与した。透析時間は 60 分とした。

2) P-セレクチン発現率の測定

P-セレクチンは、血小板の α 顆粒の構成成分ならびに血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体の膜に存在する膜糖タンパクである。非活性状態の血小板では α 顆粒膜上に存在し、血小板膜表面には存在しない。血小板が活性化されると α 顆粒が開放小器官と癒合し、顆粒内容物が開放小器官を通じて放出され、P-セレクチンが血小板膜表面に発現する。P-セレクチンは、活性化した血小板と顆粒球や単球との細胞接着を媒介する。P-セレクチンの膜表面への発現は顆粒放出反応を反映する血小板活性化マーカーとして測定されており、血小板が活性化した際に α 顆粒膜から放出される物質で古くから血小板活性化マーカーとして使用されてきた β トロポグロブリン(β -TG)の測定よりも、手技的な影響を受けにくいとされている。

血液透析を開始する前の循環 PRP(血液透析開始前)と開始 5 分後、30 分後、60 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから PRP を 400 μ L サンプルングした。P-セレクチン発現率をフローサイトメトリーによって測定した。手順は以下のように行った。

- ① あらかじめ 9 mM EDTA-PBS 溶液 400 μ L を入れたマイクロチューブにサンプルングした PRP 400 μ L を加えた。
- ② 3000 rpm、10 分間遠心分離し、血小板ペレットを作製した。
- ③ 上澄みを捨てタッピングをした後、EDTA-PBS 溶液 400 μ L を加えピペッティングし、7600 rpm で 1 分間遠心分離した。
- ④ 上澄みを捨てタッピングをした後、0.1 M PBS 溶液(pH 7.4)を 400 μ L 加えピペッティングし、7600 rpm で 1 分間遠心分離した。
- ⑤ 上澄みを捨てタッピングをした後、PBS 溶液 400 μ L を加えピペッティングし、血小板浮遊液を作製した。
- ⑥ 蛍光色素 PE で標識された抗 P-セレクチン抗体 20 μ L を加えて vortex した後、on ice / 遮光下で 45 分間インキュベートした。
- ⑦ 1%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(PFA)(pH 7.4)400 μ L を加えて vortex した後、on ice / 遮光下で 7 分間インキュベートした。
- ⑧ PBS 溶液 400 μ L を加えピペッティングし、7600 rpm で 1 分間遠心分離した。
- ⑨ 上澄みを捨てタッピングをした後、⑧を繰り返した。
- ⑩ 上澄みを捨てタッピングをした後、PBS 溶液 400 μ L を加え、血小板浮遊液を作製した。エッペンチューブの壁面に残った血小板をピペッティングで洗い落とし、マイクロチューブに移した。
- ⑪ ⑩で空になったエッペンチューブに PBS 溶液 600 μ L を加え、壁面に残る血小板をピペッティングで洗い落とし、ファルコンチューブに移した(全体が 1 mL となる)。

- ⑫ フローサイトメーターによって、P-セレクトリンを発現している血小板を測定した。

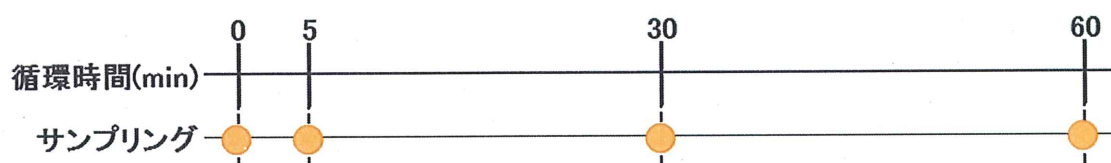


図 2.11 実験 2.4 スケジュール

3) 統計処理

2)で得た結果を、統計解析ソフト Free JSTAT ver.12.5 を用いて解析した。透析時間を因子とし、対応のある t 検定により有意差を検討した。 p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

- ・ 鉗子
- ・ シリンジ (テルモ株式会社)
- ・ 18G 注射針 (テルモ株式会社)

2) 測定系

- ・ 遠心分離器 LC-230 (株式会社トミー精工)
- ・ VORTEX GENIE 2 (Scientific Industries)
- ・ 吸光度計 UV / VIS Spectro photometer V-530 (日本分光株式会社)
- ・ リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (Wako 社)
- ・ リン酸水素二ナトリウム・十二水 (Wako 社)
- ・ シアン化カリウム (Wako 社)
- ・ フェリシアン化カリウム (Wako 社)
- ・ ミリ-Q
- ・ マイクロピペット PIPETMAN (GILSON 社)
- ・ ピペットチップ (ビーエム機器株式会社)
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ (トレフラボ社)
- ・ 遠沈管 (CELLSTAR 社)
- ・ 試験管
- ・ シリンジ (テルモ株式会社)
- ・ ストップウォッチ

2.5.3 実験準備

1) 血液側

ブタ血液の調製

2.1.3 と同様の処理を行った。

2) 透析液側

透析液は、カーボスターB 剤 1 溶に対して RO 水 26 溶を加えて希釈し、この希釈液 34 溶に対して A 剤 1 溶を加えて 90 L 作製した。作製した透析液 90 L にクエン酸三ナトリウム二水和物を 113.18 g を加えた(終濃度 4.0 mM)。

また、ダイアライザ手前の透析液供給ラインに人工肺を接続した。NO ガスを付加しない群を Control 群、NO ガスを付加する群を NO 付加群として、人工肺の血液側に透析液、ガス側に濃度を調節した混合ガスを流量 500 mL/min で吹送した。ガス濃度は、流量を流量計によって調節することで調整した(表 2.3、図 2.12)。

3) プライミング

本研究の実験回路の血液側は血液回路、ダイアライザ、腹水濾過濃縮用血液回路で構成され、血液回路の動脈側と静脈側を腹水濾過濃縮用血液回路に接続することで、血液は血液回路、ダイアライザを循環する方法とした。血液回路とダイアライザは、生理食塩液でプライミングを行った。透析液側は透析液でプライミングを行った。

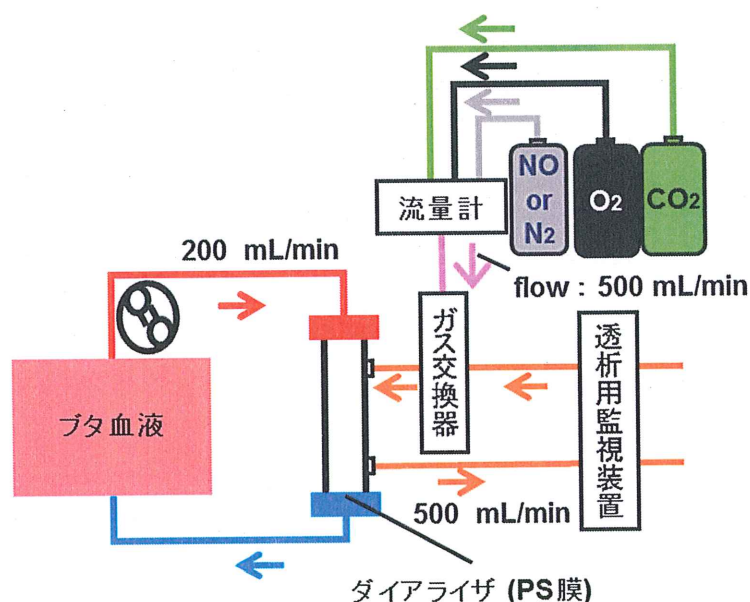


図 2.12 実験 2.5 回路

4) 試薬準備

1. 0.1 M リン酸緩衝液 PBS (pH 6.6)

表 2.5 の各試薬を純水に溶かして作製した。作製したものを遠沈管に入れ、冷蔵保管した。

表 2.5 リン酸緩衝液分量

0.1 M PBS (pH 6.6)	1 L
純水	980 g
リン酸二水素ナトリウム・二水和物	12.469 g
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物	7.262 g

2. 20%フェリシアン化カリウム水溶液

フェリシアン化カリウム 2 g を蒸留水に溶かして 10 mL とする。

3. 5%シアン化ナトリウム水溶液

シアン化ナトリウム 0.5 g を蒸留水に溶かして 10 mL とする。

2.5.4 実験方法

1) 実験条件

Control 群、NO 付加群の 2 つの条件について、ブタ血液を流量 200 mL/min でダイアライザに循環させ、透析液流量 500 mL/min、ガス流量 500 mL/min で並流操作にて血液透析を行った。実験中、腹水濾過濃縮用血液回路は 37°C の恒温槽で加温し、攪拌機で腹水濾過濃縮用血液回路中の血液を攪拌した。血液回路と腹水濾過濃縮用血液回路は、ブドウ糖注射液 19 mL にメシル酸ナファモスタットを 10 mg 加えた液を 5 mL/hr で投与した。透析時間は 60 分とした。

2) Met-Hb 濃度の測定

血液透析を開始する前の循環血液(血液透析開始前)と透析開始 5 分後、30 分後、60 分後にダイアライザ出口側の採血ポートから血液を 200 μ L サンプルングした。血液中の Met-Hb 濃度をシアンメトヘモグロビン法によって測定した。血液中の Met-Hb はシアン化合物(シアン化ナトリウム、シアン化カリウム等)を添加すると、シアンメトヘモグロビンに変換される。pH 6.6 における Met-Hb の吸光度は 630 nm で最大であり、シアンメトヘモグロビンの吸光度は 540 nm で最大となり 630 nm では吸収を示さない。したがって、シアン化合物添加前後の 630 nm での吸光度の差は Met-Hb の吸光度を表しており、Met-Hb 濃度と比例する。Met-Hb にもシアンメトヘモグロビンにも吸収を持たない 680 nm での吸光度を同時に測定し、630 nm での吸光度と 680 nm での吸光度の差をそれぞれ L_a 、 L_b 、 L'_a 、 L'_b として計算する。手順は以下のように行った。

- ① あらかじめミリ-Q 8 mL を 2 本の 15 mL 遠沈管に分注した。
- ② サンプルングした血液を 100 μ L ずつ遠沈管に入れ転倒混和し、30 分間室温に静置して完全に溶血させた。
- ③ 0.1 M PBS (pH 6.6) 2 mL を加え転倒混和した後、3000 rpm で 10 分間遠心分離をした。
- ④ 3 本の試験管に上清を 5 mL ずつ分注した(遠沈管に残った上清を試料 a とし、分注したものをそれぞれ試料 b、c、d とする)。
- ⑤ 試料 a を vortex した後、630 nm および 680 nm の吸光度を測定した。
- ⑥ 試料 b に 5 %シアン化カリウム水溶液を 50 μ L 加え、vortex した後、630 nm および 680 nm の吸光度を測定した。
- ⑦ 試料 c および試料 d に 20 %フェリシアン化カリウム水溶液を 50 μ L 加え、vortex した後 30 分間静置した。

- ⑧ 試料 c を再び vortex した後、630 nm および 680 nm の吸光度を測定した。
- ⑨ 試料 d に 5 %シアン化カリウム水溶液を 50 μ L 加え、vortex した後、630 nm および 680 nm の吸光度を測定した。
- ⑩ 各試料において測定した吸光度の差 L を以下のように求めた。

$$\text{試料 a : } L_a = (\text{吸光度}_{630\text{nm}}) - (\text{吸光度}_{680\text{nm}})$$

$$\text{試料 b : } L_b = (\text{吸光度}_{630\text{nm}}) - (\text{吸光度}_{680\text{nm}})$$

$$\text{試料 c : } L'_a = (\text{吸光度}_{630\text{nm}}) - (\text{吸光度}_{680\text{nm}})$$

$$\text{試料 d : } L'_b = (\text{吸光度}_{630\text{nm}}) - (\text{吸光度}_{680\text{nm}})$$

- ⑪ ⑩で得た L_a 、 L_b 、 L'_a 、 L'_b を下記の計算式に代入し、総ヘモグロビン中に占める Met-Hb の比率(%)を求めた。

$$\text{Met-Hb (\%)} = (L_a - L_b) / (L'_a - L'_b) \times 100$$

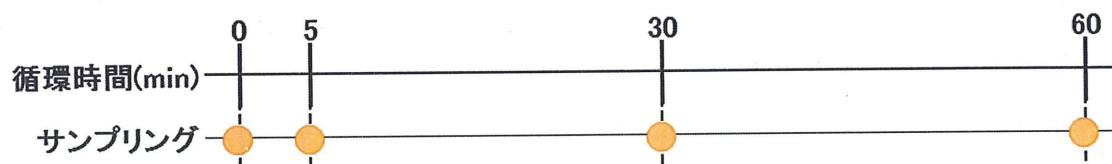


図 2.13 実験 2.5 スケジュール

3) 統計処理

2) で得た結果を、統計解析ソフト Free JSTAT ver.12.5 を用いて解析した。NO の有無と透析時間を因子とし、二元配置を行った。検定は繰り返しありの分散分析を用い、有意差を検討した。 p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

第3章 結果

3.1 ニトロプルシドナトリウムを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制

NO 供与体であるニトロプルシドナトリウムを透析液側に投与することで NO を付加し、NO による血小板活性化の抑制効果を検討した。

3.1.1 血小板凝集能の測定

透析膜 PS 膜、PMMA 膜を用いた、4 時間の血液透析実験において、循環血液の血小板凝集能を測定し、血小板凝集能に対する NO の影響を検討した。PS 膜は 4 回、PMMA 膜は 3 回、同様の実験を行った。測定結果を、横軸を血小板凝集惹起物質の濃度、縦軸を血小板凝集能、グラフの左半分を Control 群、右半分を NO 付加群として、血液循環を開始する前の血液(-60 分)と血液循環開始 30 分後(-30 分)、血液透析開始前、血液透析 30 分後、血液透析 240 分後に分けてグラフに示した(図 3.1)。

血液透析開始前において、Control 群とニトロプルシドナトリウム投与前の NO 付加群を比較すると、血小板凝集能に違いがみられないことが確認できた。しかし、透析開始 30 分後においては、NO 付加群のほうが Control 群と比べて血小板凝集能が有意に減少した。これは、PS 膜、PMMA 膜のどちらにおいても同様で、また、血小板凝集惹起物質が ADP、コラーゲンのどちらにおいても同様であった。

また、血液透析開始 240 分後においては、PMMA 膜の血小板凝集能が Control 群と NO 付加群で差がみられなかったが、PS 膜では、NO 付加群のほうが Control 群と比べて血小板凝集能が有意に減少した。

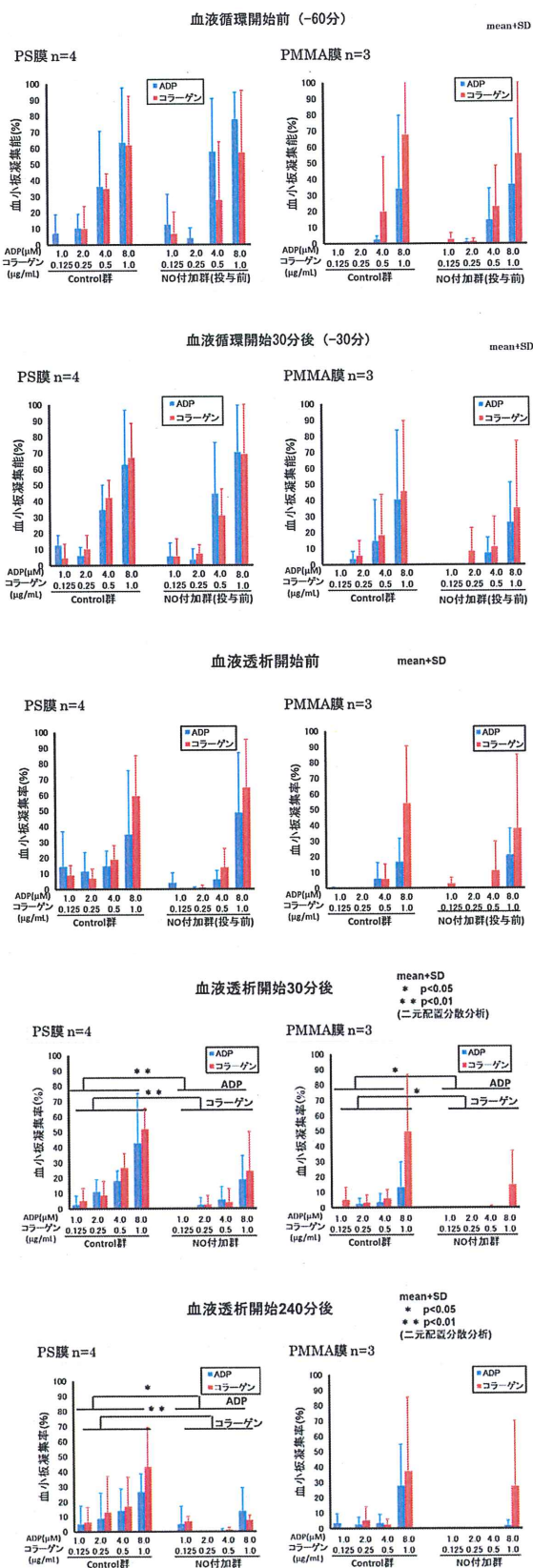


図 3.1 NO が血小板凝集に与える影響

3.1.2 血小板数の測定

透析膜 PS 膜、PMMA 膜を用いた、4 時間の血液透析実験において、血小板数を測定し、血小板数に対する NO の影響を検討した。測定結果を、横軸を時間、縦軸を血小板変化率としてグラフに示した(図 3.2)。また、血小板数をそれぞれ血液透析開始前の血小板数で除し、血小板変化率とし、血小板変化率に対する NO の影響を検討した(図 3.3)。

Control 群と NO 付加群を比較すると、NO 付加群と Control 群では血小板数、血小板変化率ともに差はみられなかった。これは PS 膜、PMMA 膜のどちらにおいても同様であった。

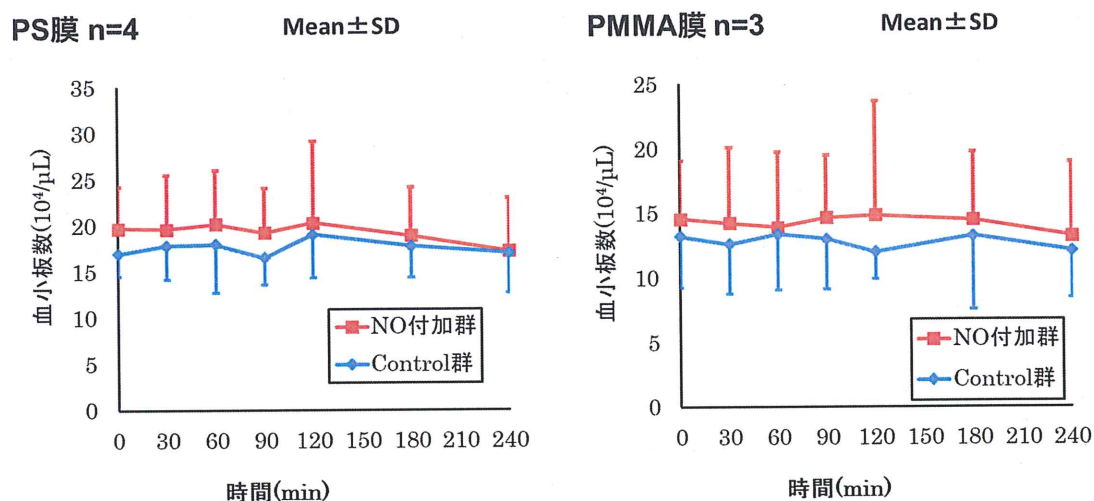


図 3.2 NO が血小板数に与える影響 (左 : PS 膜、右 : PMMA 膜)

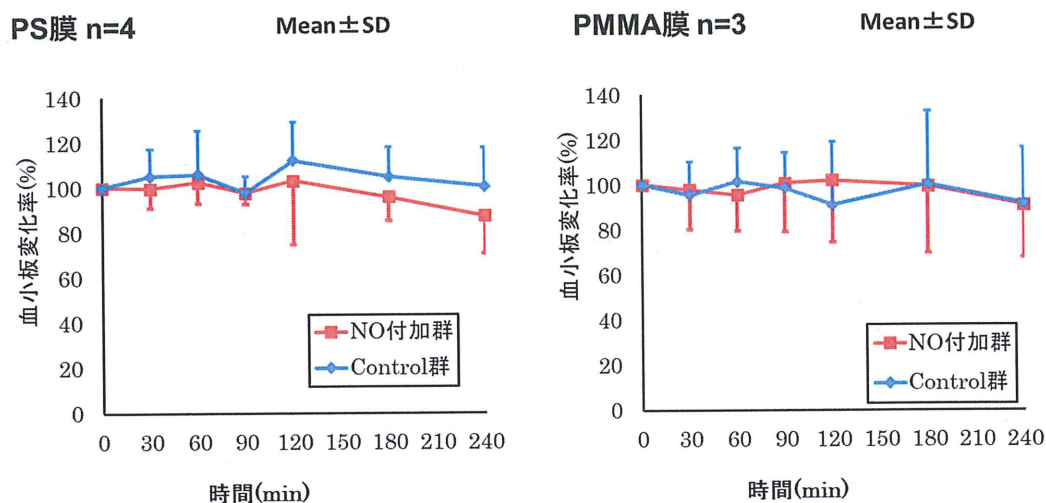


図 3.3 NO が血小板変化率に与える影響 (左 : PS 膜、右 : PMMA 膜)

3.1.3 血小板中 cGMP 量の測定

透析膜 PS 膜用いた、4 時間の PRP 透析実験で採取したサンプルを用いて、ELISA 法にて得られた cGMP 濃度(図 3.4)を血小板数(図 3.5)で除し、血小板 10^{11} 個あたりの血小板中 cGMP 量を算出した。測定結果を、横軸を時間、縦軸を血小板 10^{11} 個あたりの cGMP 量としてグラフに示した。(図 3.6)

血液透析開始前において、Control 群とニトロプルシドナトリウム投与前の NO 付加群を比較すると、NO 付加群が 135 ± 159 pmol であったのに対し、Control 群が 152 ± 208 pmol と血小板中 cGMP 量に違いがみられないことが確認できた。しかし、透析開始 30 分後においては、NO 付加群が 372 ± 327 pmol であったのに対し、Control 群が 188 ± 331 pmol となり、NO 付加群のほうが Control 群と比べて血小板中 cGMP 量が有意に上昇した($p < 0.05$)。血液透析開始 240 分後でも同様に、NO 付加群が 398 ± 339 pmol であったのに対し、Control 群が 161 ± 150 pmol となり、Control 群と比べて血小板中 cGMP 量が有意に上昇した($p < 0.05$)。

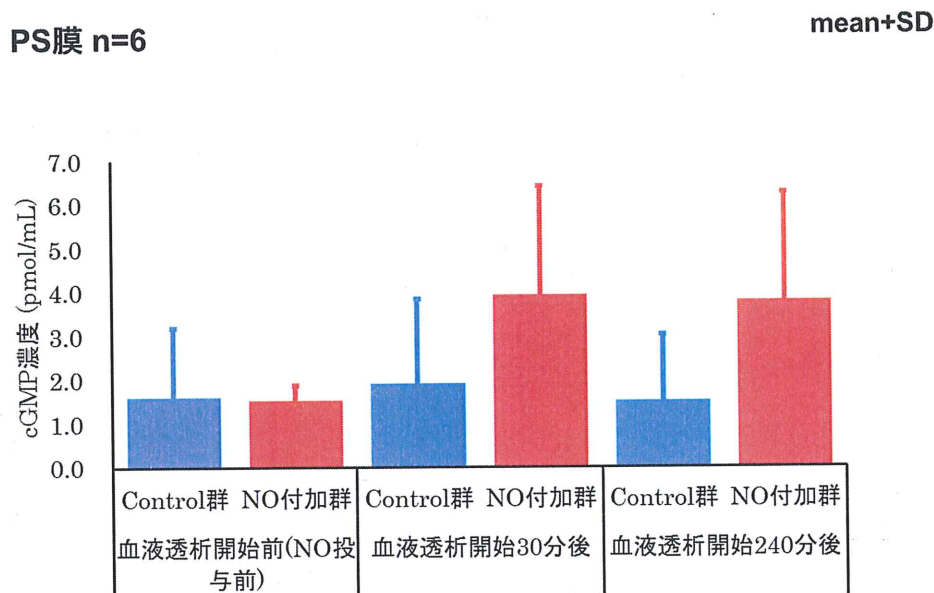


図 3.4 cGMP 濃度

PS膜 n=6

mean±SD

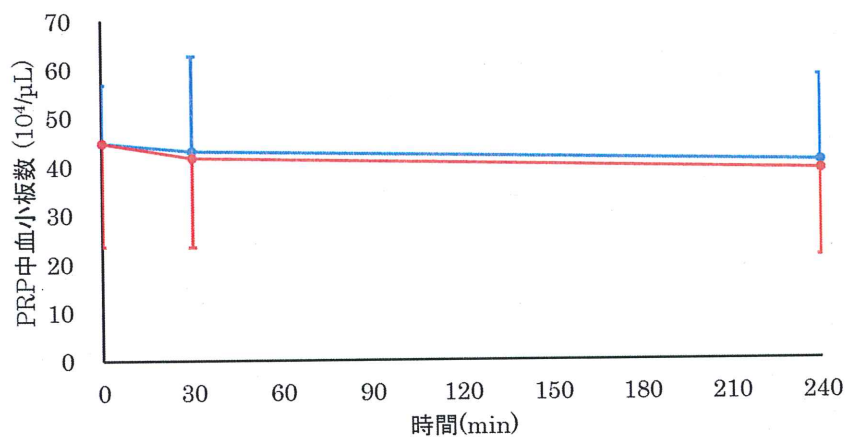


図 3.5 PRP 中血小板数

PS膜 n=6

mean+SD

* p<0.05

対応のあるt検定

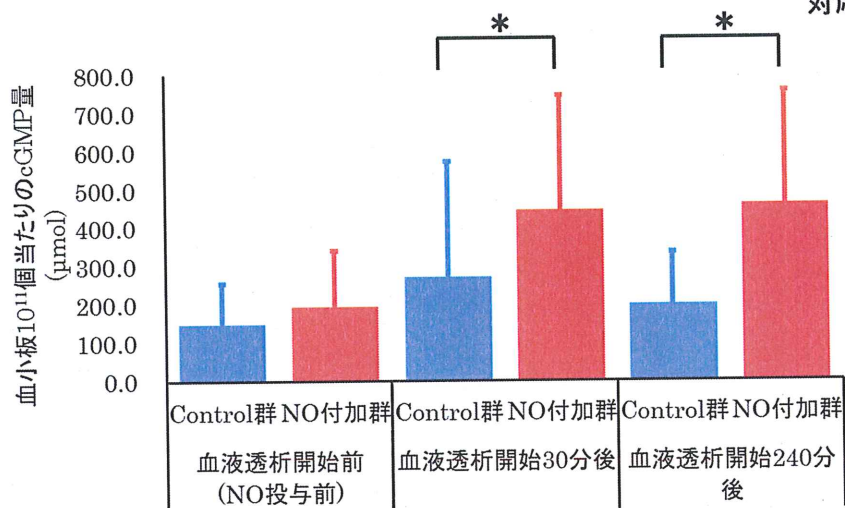


図 3.6 NO が血小板中 cGMP 量に与える影響

3.2 NO ガスを透析液側に付加したときの溶存 NO 濃度の測定

透析膜 PS 膜を用いた、60 分の血液透析実験で採取したサンプルを用いて、透析液にガス交換器を介して NO ガスを付加したとき、ブタ血液中においてどの程度 NO が溶存しているか測定した。NO の代謝産物である NO_2^- と NO_3^- の濃度を Griess 法によって測定し、間接的に NO 濃度を測定した。

測定結果を、横軸を透析時間、縦軸を濃度としてグラフに示した(図 3.7)。血液透析において透析液に NO ガスを付加したとき NO_2^- と NO_3^- の濃度は低値であった。また、測定に用いた試薬の検出範囲は $10 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ であるが、その範囲外であった。

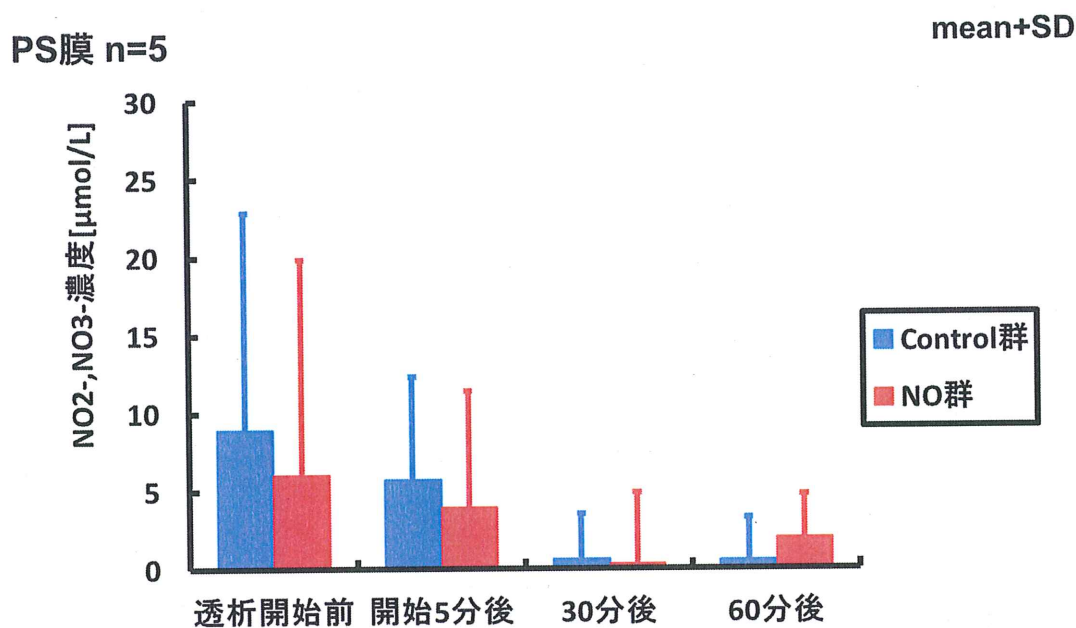


図 3.7 血中溶存 NO 濃度

3.3 NO ガスを透析液側に付加し、透析液を循環させた場合の溶存 NO 濃度の測定

3.2 から血液透析において透析液に NO ガスを付加したとき NO_2^- と NO_3^- の濃度は低値であり、測定に用いた試薬の検出範囲外であった。このことから、透析液に NO ガスが付加できていない、または排出された透析液中に NO が含まれていたため検出できなかった可能性があった。そこで、透析液側を閉回路とし 2.2 と同様に NO 濃度を測定する必要があると考えた。

透析膜 PS 膜を用いた、4 時間の血液透析実験で採取したサンプルを用いて、透析液にガス交換器を介して NO ガスを付加したとき、ブタ血液中と透析液中においてどの程度 NO が溶存しているか測定した。NO の代謝産物である NO_2^- と NO_3^- の濃度を Griess 法によって測定し、間接的に NO 濃度を測定した。

測定結果を、横軸を透析時間、縦軸を濃度としてグラフに示した(図 3.8、3.9)。

透析開始後の Control 群における NO_2^- 、 NO_3^- 濃度は約 $10\sim 20\ \mu\text{mol/l}$ であったのに対し、NO 付加群では時間が経過する毎に濃度が上昇した。これは、血液中でも透析液中でも同様であった。透析開始後の Control 群における NO_2^- 、 NO_3^- 濃度は約 $10\sim 20\ \mu\text{mol/l}$ であったのに対し、NO 付加群では時間が経過する毎に濃度が上昇した。これは、血液中でも透析液中でも同様であった。

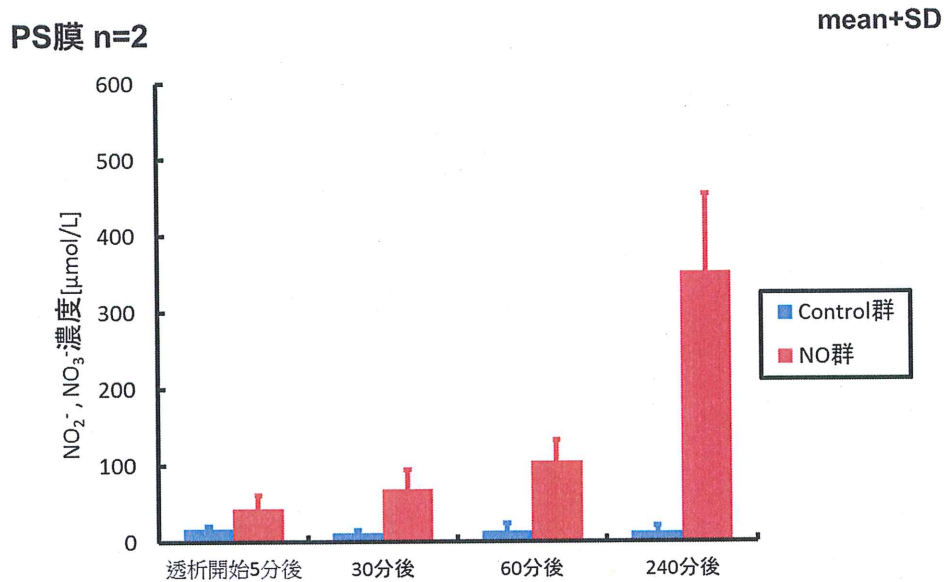


図 3.8 透析液を循環させた場合の血液透析における透析液中 NO_2^- , NO_3^- 濃度

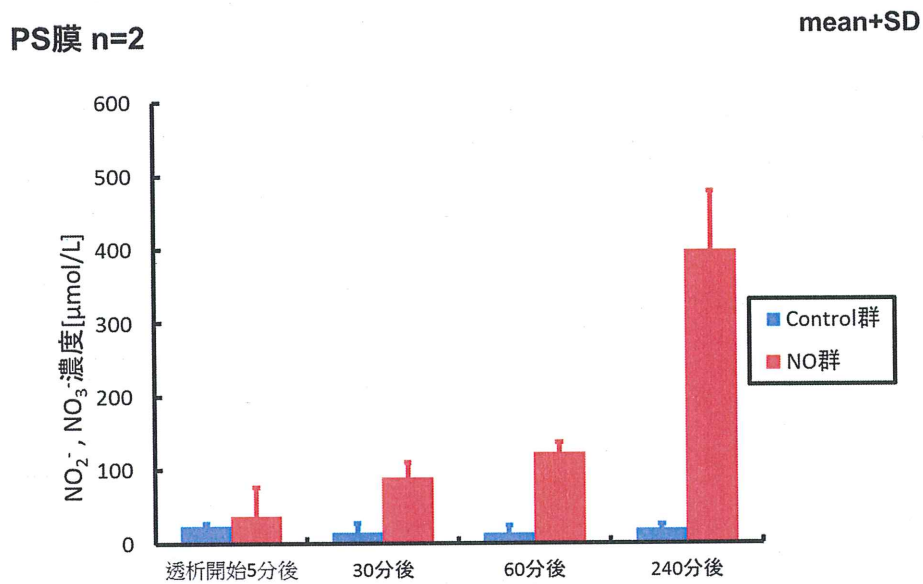


図 3.9 透析液を循環させた場合の血液透析における血中 NO_2^- , NO_3^- 濃度

3.4 NO ガスを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制

透析膜 PS 膜を用いた、60 分の PRP 透析実験で採取したサンプルを用いて、NO ガスを透析液に付加した場合と NO ガスを付加しなかった場合の PRP 中の血小板の P-セレクチン発現率を測定し、血小板の活性化を比較検討した。

P-セレクチン発現率をフローサイトメトリーによって測定し、血小板活性化に対する NO の影響を検討した。

測定結果を、横軸を透析時間、縦軸を P-セレクチン発現率としてグラフに示した(図 3.10)。

Control 群と NO 付加群を比較すると、NO 付加群と Control 群では P-セレクチン発現率に差はみられなかった。そこで、透析開始 5 分後、30 分後、60 分後の P-セレクチン発現率が透析前と比べて差があったかどうか検討した。縦軸を P-セレクチン発現率、グラフの左半分を Control 群、右半分を NO 付加群としてグラフに示した(図 3.11-13)。

透析開始前と開始 5 分後の P-セレクチン発現率を比較すると、Control 群では透析開始 5 分後に $12.80 \pm 4.55\%$ であり、透析開始前の $10.02 \pm 3.34\%$ から 30 % 有意に上昇していたのに対し($p < 0.05$)、NO 付加群では透析開始 5 分後に $13.71 \pm 7.38\%$ であり、透析開始前の $12.34 \pm 8.13\%$ から有意な上昇はみられなかった(図 3.11)。

透析開始前と開始 30 分後の P-セレクチン発現率を比較すると、Control 群では透析開始 30 分後に $6.91 \pm 2.90\%$ 、NO 付加群では $6.95 \pm 2.69\%$ であり、Control 群と NO 付加群どちらも発現率は低下したが、有意な差はみられなかった(図 3.12)。

透析開始前と開始 60 分後の P-セレクチン発現率を比較すると、Control 群では透析開始 60 分後に $5.38 \pm 3.10\%$ 、NO 付加群では $7.00 \pm 5.07\%$ であり、Control 群と NO 付加群どちらも発現率は有意に低下した($p < 0.05$)(図 3.13)。

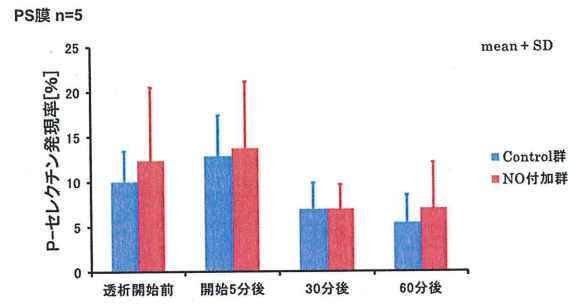


図 3.10 NO による血小板活性化の抑制

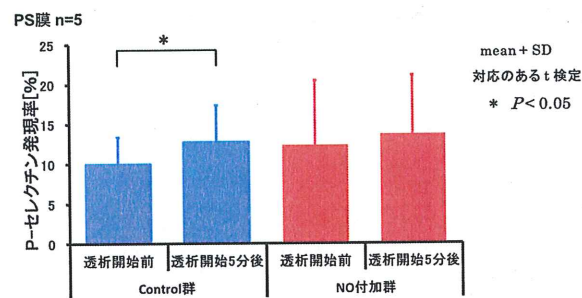


図 3.11 血液透析開始 5 分後の NO による血小板活性化の抑制

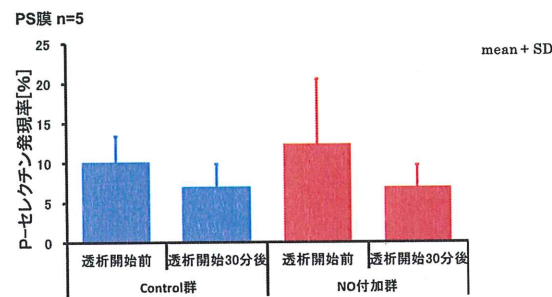


図 3.12 血液透析開始 30 分後の NO による血小板活性化の抑制

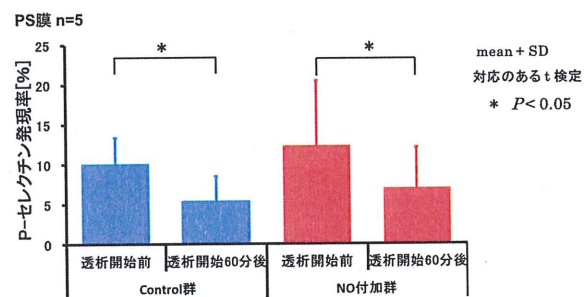


図 3.13 血液透析開始 60 分後の NO による血小板活性化の抑制

3.5 NO ガスを透析液側に付加したときの Met-Hb 濃度測定

透析膜 PS 膜を用いた、4 時間の血液透析実験で採取したサンプルを用いて、NO ガスを透析液に付加した場合と NO ガスを付加しなかった場合の血中 Met-Hb 濃度を検討した。

Met-Hb 濃度を測定し、NO ガスを透析液に付加した場合と付加しなかった場合の NO の影響を検討した。

測定結果を、横軸を透析時間、縦軸を Met-Hb 濃度としてグラフに示した(図 3.14)。測定結果がマイナスの値となった際は Met-Hb を検出しなかったとみなし、0%とした。

透析開始前、開始 5 分後、30 分後、60 分後のいずれにおいても NO 付加群の Met-Hb 濃度は循環実験中 2.5 %未満で、Control 群と同程度であり、副作用の許容範囲の 10 %を下回った値であった。

PS膜 n=5

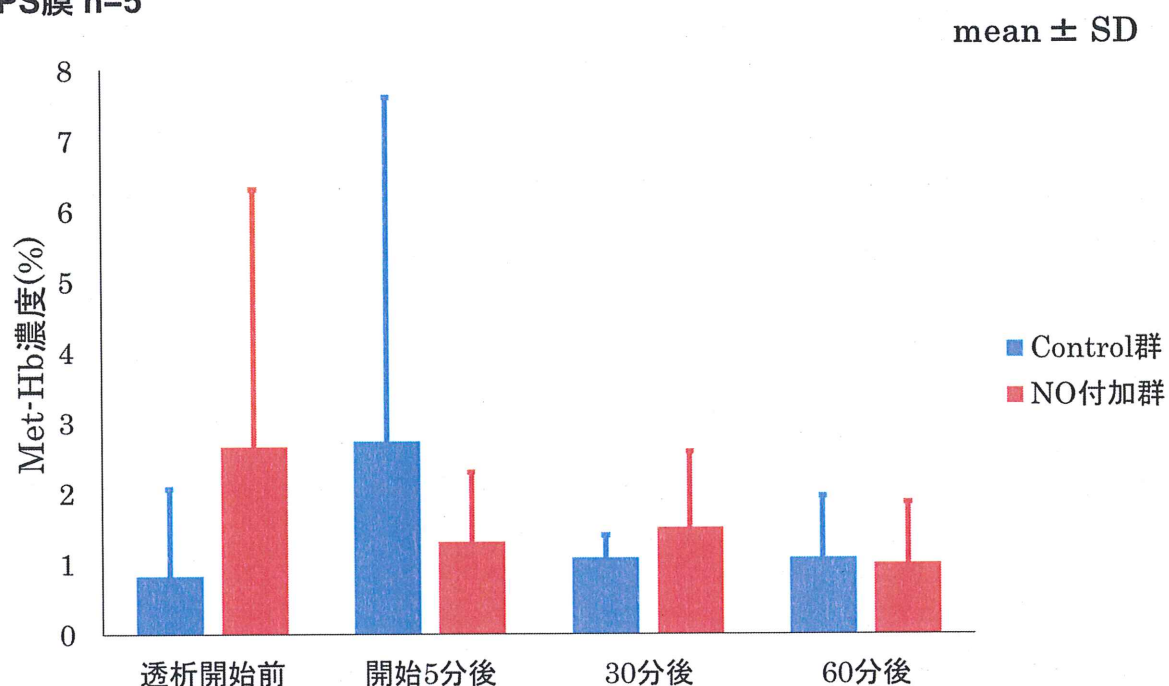


図 3.14 NO を付加したことによる Met-Hb 濃度の影響

第4章 考察

4.1 ニトロプルシドナトリウムを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制--

4.1.1 血小板凝集能の測定

NO を付加することで血小板凝集能が抑制されることを期待して本測定を行った。3.1.1 より血液透析開始前において、Control 群とニトロプルシドナトリウム投与前の NO 付加群を比較すると、血小板凝集能に違いがみられないことが確認できた。しかし、透析開始 30 分後においては、NO 付加群のほうが Control 群と比べて血小板凝集能が有意に減少し、血小板の凝集抑制がみられた。これは、PS 膜、PMMA 膜のどちらにおいても同様で、また、血小板凝集惹起物質が ADP、コラーゲンのどちらにおいても同様であった。また、血液透析開始 240 分後においては、PMMA 膜による血小板凝集能が Control 群と NO 付加群で差がみられなかったが、PS 膜では、NO 付加群のほうが Control 群と比べて血小板凝集能が有意に減少し、血小板の凝集能抑制がみられた。

このことから、血液透析において、透析液に NO を付加することで血小板の凝集能が抑制されたと考えられた。

4.1.2 血小板数の測定

NO を付加することで、血液が透析膜や血液回路と接触した際の血小板凝集による血小板の減少を抑制されること期待して本測定を行った。しかしながら、3.1.2 より統計的な有意差はみられなかった。これは、NO により凝集能や反応性の低下は抑えられているものの、本実験系では、基本的に血小板凝集を抑えていたため、実際に透析中の血小板の活性化による凝集などによる血小板の消費はそれほど多くなく、循環中の血小板量を変化させるほどではなかったと考えられた。

4.1.3 血小板中 cGMP 量の測定

NO を付加することで、cGMP 量の上昇を介した経路による血小板凝集抑制作用の程度を明らかにすることを目的として本測定を行った。3.1.3 より血液透析開始前において、Control 群とニトロプルシドナトリウム投与前の NO 付加群を比較すると、血小板中 cGMP 量に違いがみられないことが確認できた。しかし、透析開始 30 分後においては、NO 付加群のほうが Control 群と比べて血小板中 cGMP 量が有意に上昇した。これは、血液透析開始 240 分後でも同様であった。このことは NO の効果を示していると考えられた。NO の作用機序は、血小板の場合も、平滑筋の場合とほぼ同様と考えられている。NO はグアニル酸シクラーゼを活性化させ、平滑筋や血小板中で、cGMP 濃度を上昇させる²²⁾。cGMP は、プロテインキナーゼ G (PKG) を活性化させるが、平滑筋では、それが直接筋弛緩作用につながるとともに、筋肉の収縮に必要な Ca の小胞体へ取り込みを促進することで、筋肉を弛緩させる。一方、血小板でも、PKG が活性化し、同様に細胞内の Ca^{2+} の流入を抑制することで血小板の活性化を抑制することが知られている²³⁾ (図 4)。また、血小板では、PKG ではなく、sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase を介して Ca^{2+} の小胞体への取り込みを促進する機序も知られている。また、本実験ではブタ血液ではなく PRP を使用した。PRP には血球成分による影響が排除されているため、より基礎的な実験を行うことができ、血小板中の cGMP 濃度が NO によって上昇する様をより鮮明にとらえることができたと考えられた。

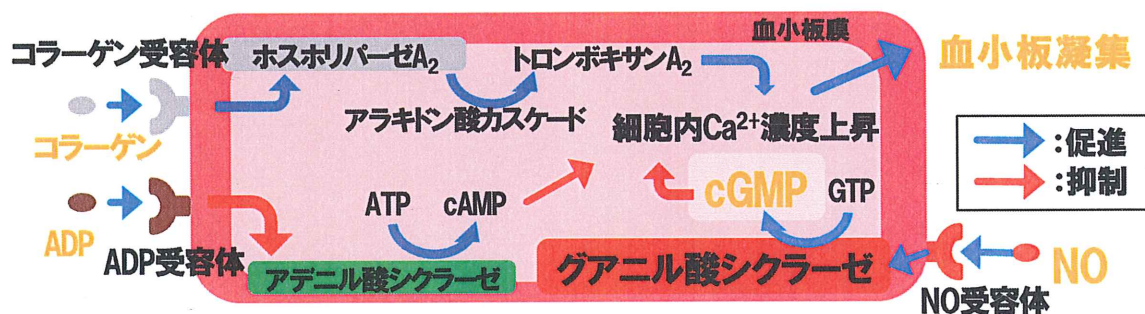


図 4. 血小板凝集反応と NO による抑制

4.1.4 膜素材の違いについて

本研究では PS 膜と PMMA 膜の 2 種類の透析膜を使用した。PS 膜は血液透析治療において一般に使用される素材の透析膜であり、PMMA 膜は「血液浄化器の機能分類 2013」によると特別な機能を持つ血液浄化器に分類されており²⁴⁾、吸着特性を有する膜素材である。しかしながら、本研究では、透析液に含まれる NO の可能性を明らかにすることを主な目的としていたため、膜材料にあまり重点を置かなかった。ただし、血液透析治療中の血小板に対する NO の影響は、使用する膜材料の種類によって異なる可能性がある。この点を明らかにするには、さらなる検討が必要である。

4.1.5 ニトロプルシドナトリウムについて

1 mol のニトロプルシドナトリウムから 1 mol の NO が放出され、またニトロプルシドの半減期は 3~4 分と非常に短いことから、投与した量すべてが、NO になって血液中へ移行したと考えられた。今回、ニトロプルシドナトリウム濃度は、0.1 mM、これを 100 μ L/min の速度で投与したため、定常状態においては、10 nmol/min の速度で、血中に NO が供給されていたと考えられた。一方、NO にはその他の作用として血管拡張作用を有している^{25,26)}。実際の透析治療に用いることを想定すると、血管拡張による血圧低下の副作用が懸念される。

NO をスイープガスと混合する^{27,28)}、または NO 放出材料を使用する^{29,30)}方法で、NO ガスを膜型人工肺に使用し血小板の接着性の低下に成功した試みが過去に行われている。しかし、NO 放出材料を透析膜表面へ添加することは、膜の表面の質感と化学的性質の変化を引き起こし、透析膜自体の生体適合性の低下を引き起こす可能性が考えられる。したがって、現在利用可能な改良された透析膜を使用しながら透析液側から NO を供給することが、透析膜の生体適合性を妨げることなく NO を供給する最も効果的な方法であると考えられている。

そこで、ニトロプルシドナトリウムの代わりに NO ガスを用いて NO を透析液に溶存させることで、ニトロプルシドナトリウムの副作用を起こすことなく NO を付加できると考えた。

4.1.6 まとめ

4.1.1~4.1.3 より血液透析において、透析液側から NO を付加することで、血液透析膜を介して NO が血中の血小板に作用し、NO の効果である血小板の凝集の抑制が起こったと考えられた。

4.2 NO ガスを透析液側に付加したときの溶存 NO 濃度の測定

NO ガスを付加することで、透析液に NO が付加され、代謝産物である NO_2^- と NO_3^- の濃度が上昇することを期待し、本測定を行った。しかしながら、3.2 より血液透析において透析液に NO ガスを付加したときの血中の NO_2^- と NO_3^- の濃度はどちらも低値であった。また、測定に用いた試薬の検出範囲は $10\sim 100\ \mu\text{mol/L}$ であるが、その範囲外であった。このことから、透析液に NO ガスが付加できていない、または透析液中に含まれる NO が血液中へ移行せず排出されていたため、検出できなかった可能性があると考えられた。

4.3 NO ガスを透析液側に付加し、透析液を循環させた場合の溶存 NO 濃度の測定

3.2 では明らかにできなかった NO 付加の有無を確認するために本測定を行った。透析液側の回路を閉回路とすることで、NO ガスの付加によって NO が透析液へ付加された際の NO の代謝産物である NO_2^- 、 NO_3^- の排出を防いだ。3.3 より透析開始後の Control 群における NO_2^- 、 NO_3^- 濃度は約 $10\sim 20\ \mu\text{mol/L}$ であり、NO 付加群では時間が経過する毎に濃度が上昇した。これは、血液中でも透析液中でも同様であった。このことから、透析液を循環させたことで NO 付加群では NO の代謝産物である NO_2^- 、 NO_3^- が透析液中に蓄積され、 NO_2^- 、 NO_3^- の濃度が上昇したと考えられる。これにより、NO ガスをガス交換器を介して透析液に NO が付加できていることが確認できた。

4.4 NO ガスを透析液側に付加したときの血小板活性化の抑制

NO を付加することで、活性化した血小板の膜表面に発現する P-セレクチンの発現率が抑制されることを期待して、本測定を行った。3.4 より透析開始前と開始 5 分後の P-セレクチン発現率を比較すると、Control 群では P-セレクチン発現率は有意に上昇したが、NO 付加群では有意な上昇はみられなかった。このことから、透析液から血液に入った NO は、血液が透析膜と接触した際に引き起こされる血小板活性化のうち、初期の血小板活性化を低減させた可能性があると考えられる。

透析開始前に対して、開始 30 分後の P-セレクチン発現率は Control 群と NO 付加群どちらも発現率は低下したが、有意な差はみられなかった。NO 付加群において透析液から血液に入った NO は、血液が透析膜と接触した際に引き起こされる血小板活性化を低減させた可能性があると考えられる。しかし、Control 群においても発現率は低下傾向であったことから、発現率の低下は NO によるものなのか、この実験結果からは判断できない。また、活性化により凝集塊となった血小板が透析膜と接着してしまい測定できなかった可能性もあると考えられる。

透析開始前と開始 60 分後の P-セレクチン発現率を比較すると、Control 群と NO 付加群どちらも発現率は有意に低下した。NO 付加群において透析液から血液に入った NO は、血液が透析膜と接触した際に引き起こされる血小板活性化を低減させた可能性があると考えられる。しかし、Control 群においても発現率に有意な低下がみられたことから、発現率の低下は NO によるものなのか、この実験結果からは判断できない。また、活性化により凝集塊となった血小板が透析膜と接着してしまい測定できなかった可能性もあると考えられる。

透析開始前における Control 群と NO 付加群の P-セレクチン発現率はどちらも 10%程度とやや高値であった。本実験でも 2.1.3 と同様、PRP を使用して血小板に発現する P-セレクチンを鋭敏にとらえようと試みたが、かえって PRP を回路やダイアライザに置換する際、あるいはサンプリングした PRP の複雑な処理が、血小板に影響を与えた可能性も考えられる。

4.5 NO ガスを透析液側に付加したときの Met-Hb 濃度測定

NO を付加しても、副作用である Met-Hb の濃度の上昇が起こらないことを期待して本測定を行った。3.5 より透析開始前、開始 5 分後、30 分後、60 分後のいずれにおいても Control 群と NO 付加群のどちらも低い値となり、差はみられなかった。また、副作用の許容範囲の 10%を下回っていた。3.3 より透析液に NO ガスを付加すると、透析液中に NO が溶存していることは明らかとなっているため、NO ガスを用いて NO を透析液に付加しても NO の副作用の危険性が低いことを示すことができた。

これらのことから、透析液から血液に NO を付加してもヘモグロビンと結合せず Met-Hb は生成されなかった。または、生成した Met-Hb が速やかに Met-Hb reductase により Hb に還元されたと考えられるが、本実験では透析開始 60 分までの結果しか得られていないため、今後は 4 時間経過しても Met-Hb が生成されないことを証明する必要があると考えられる。

4.6 今後の課題

本研究はブタ血液を使用して行ったが、血液を採取する際や採取した後輸送する際には血小板にある程度の刺激を与えている可能性がある。今後は動物を用いて、動物が活着している状態での NO 付加による血小板凝集の抑制効果、NO 付加による副作用の有無について検討していく必要があると考えられる。そして、このような副作用が起こらず、かつ NO の効果を得ることができる適切な NO 濃度を検討する必要がある。

また、血管拡張薬として使用されるニトロプルシドナトリウムを NO 供与体とすると、低血圧を引き起こす可能性がある。この対応策としては、NO ガスを用いる方法と半減期の非常に短い NO 供与体を使用する方法が考えられる。現時点では、半減期が非常に短い NO 供与体は存在しないので、NO ガスを使用するのが現実的である。NO 吸入療法では、患者の血圧は低下しないことが明らかになっており³¹⁾、NO ガスを透析液に付加しても、患者の血圧は変化しないだろうと予想できるが、NO ガスや半減期の短い NO 供与体を使用した場合も、NO による低血圧が起こらないことは確認しておく必要がある。

さらに、本研究では NO を血液入口側から十分に付加するために、血液と透析液の流れを並流で行った。しかし、維持血液透析治療においては、血液と透析液の流れは向流で施行されており、この条件と比較すると、本研究のような条件では溶質除去効率が低下してしまう。したがって、本研究のような条件で施行する場合は、急性期患者に施行される継続的血液透析、夜間血液透析など、溶質の除去効率が重要でない長時間の透析治療に利用したほうが良いと考えられる。維持血液透析で利用するためには、中空糸の血液側や透析器のハウジングに NO 供与体を固定化するなど、血液に NO を付加するための別の手段を考える必要がある。

第5章 結語

動物血を用いた ex vivo 実験において、透析液側から血液に NO を付加し、透析膜と接触した血小板の活性化を抑制することができた。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導やご助言を賜りました。みなさまに厚くお礼申しあげます。

久保田勝教授には本論文の作成にあたりご指導、アドバイス頂き、また、励ましのお言葉を頂戴するなど、本論文が完成するまで温かく見守っていただきました。小林弘祐先生、小久保謙一准教授、小林こず恵助教には本研究の方針、研究方法、学会発表などでご指導、アドバイスをいただき深く感謝しております。

また、私が勤務しております医療法人財団倉田会えいじんクリニックの兵藤透先生をはじめ、スタッフのみなさまには、私の進学について応援していただき深く感謝しております。

臨床工学研究室の同期には、研究や執筆について相談に乗っていただき深く感謝しております。また、ともに励ましあうことで今まで頑張ってきたと思います。後輩のみなさまにはたいしてアドバイスもしてあげられませんでした。一生懸命研究をする姿は私にとってとてもいい刺激になりました。

最後になりましたが、私が大学院へ進学することを理解し、応援してくれた家族に深く感謝いたします。

令和2年7月28日(火)

参考文献

- 1) Campean V, Neureiter D, Varga I, Runk F, Reiman A, Garlachs C, et al. Atherosclerosis and vascular calcification in chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res* 2005;28:280-9.
- 2) Lam JY, Latour JG, Lesperance J, Waters D. Platelet aggregation, coronary artery disease progression and future coronary events. *Am J Cardiol* 1994;73:333-8.
- 3) Daub K, Lindemann S, Langer H, Seizer P, Stellos K, Siegel-Axel D, et al. The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:173-8.
- 4) Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 1974;290:697-701.
- 5) O'Hare AM, Hsu CY, Bacchetti P, Johansen KL. Peripheral vascular disease risk factors among patients undergoing hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:497-503.
- 6) Aggarwal A, Kabbani SS, Rimmer JM, Gennari FJ, Taatjes DJ, Sobel BE, et al. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. *Am J Kidney Dis* 2002;40:315-22.
- 7) Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn PF. Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* 1991;84:613-7.
- 8) Trip MD, Cats VM, van Capelle FJ, Vreeken J. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1990;322:1549-54.
- 9) Parise LV, Phillips DR. Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor. Fibrinogen binding properties of the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1985;260: 10698-707.
- 10) Kokubo K, Kurihara Y, Kobayashi K, Tsukao H, Kobayashi H. Evaluation of the biocompatibility of dialysis membranes. *Blood Purif* 2015;40:293-7.
- 11) 秋澤忠男, 牧田東陽, 北端有紀子, 金子岩和. 実用血液浄化療法—チーム医療として, 阿岸鉄三, 秀潤社, 東京, 1999, p.35-9, 44-8, 296-9.
- 12) J.C. de Graff, J.D. Banga, S. Moncada, R.M.J. Palmer, P.G. de Groot, J.J. Sixma. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 1992;85:2284-90.
- 13) Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1993;27:1380-2.

- 14) Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2479-88.
- 15) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:5193-7.
- 16) Beckman J. S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol* 1991;15:53-59.
- 17) Ichiropoulos H, Zhu L, Beckman J. S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:446-451.
- 18) 大阪健康安全基盤研究所. 血液中のメトヘモグロビン(Met-Hb)の測定法.
<http://www.iph.osaka.jp/s005/H13-1-3.pdf> (最終閲覧日 2020年8月31日)
- 19) Sylman, JL, Lantvit, SM, Reynolds MM, Neeves, KB. The relative role of soluble guanylyl cyclase dependent and independent pathways in nitric oxide inhibition of platelet aggregation under flow. *Cellular & Molecular Bioengineering* 2014;7:421-31.
- 20) Beckman, J. S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol* 1991;15:53-9
- 21) Tsukao H, Kokubo K, Takahashi H, Nagasato M, Endo T, Iizuka N, Kobayashi H. Activation of platelets upon contact with a vitamin E-coated/non-coated surface. *J Artif Organs* 2013;16:193-205.
- 22) 透析療法合同専門編集委員会：血液浄化療法ハンドブック，協同医書出版社，東京，2010，p.75.
- 23) Naseem, K. M., W. Roberts. Nitric oxide at a glance. *Platelets* 2011;22:148-152.
- 24) 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.
- 25) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
- 26) Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res* 2002;90:21-8.
- 27) Mellgren K, Friberg LG, Mellgren G, Hedner T, Wennmalm Å, Wadenvik H. Nitric oxide in the oxygenator sweep gas reduces platelet activation during experimental perfusion. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1194-8.
- 28) Mellgren K, Mellgren G, Lundin S, Wennmalm A, Wadenvik H. Effect of nitric oxide gas on platelets during open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1998;65:1335-41.
- 29) Kanya A Amoako, Patrick J Montoya, Terry C Major, Ahmed B Suhaib, Hitesh Handa, David O Brant, et al. Fabrication and In vivo Thrombogenicity Testing of Nitric Oxide

- Generating Artificial Lungs. J Biomed Mater Res A 2013;101:3511-9.
- 30) El-Ferzli GT, Andukuri A, Alexander G, Scopel M, Ambalavanan N, Patel RP, et al. A Nitric Oxide-Releasing Self-Assembled Peptide Amphiphile Nanomatrix for Improving the Biocompatibility of Microporous Hollow Fibers. ASAIO J 2015;61:589-95.
- 31) Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled Nitric Oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. Circulation 1991;83:2038-47.