

2023 年度北陸大学特別研究助成【若手研究】報告書

北陸大学長殿

所属・職名 医療保健学部医療技術学科 助教

氏名 藤井 義也

研究課題名：オンライン血液透析濾過によるアンチトロンビン漏出の影響に関する研究

申請額：1,000,000 円

研究成果の概要

血液透析患者のアンチトロンビン（AT）活性低下の原因を究明することを目的として、血液透析患者 24 名を対象に透析前後血漿、および透析液廃液を採取し解析を行った。また、使用後の透析膜を採取して AT を標的に免疫蛍光染色を行った。血液透析（HD）施行患者では AT の漏出がわずかであったが、オンライン血液透析濾過（O-HDF）施行患者ではある程度 AT が漏出していた。この AT 漏出は $\beta 2$ ミクログロブリン除去率を 70% 以下、 $\alpha 1$ ミクログロブリン除去率を 25% 以下にすることで抑制が可能であった。AT の透析膜への吸着量は HD、O-HDF で差は認められなかった。以上のことから、透析治療方法によって AT 漏出量は変化するが、透析膜への AT 吸着量に差がないことが明らかとなった。また、AT 漏出量と透析前後 AT 活性の間に相関関係を認めず、AT 漏出が AT 活性低下に影響しているとはいえなかった。

研究目的

研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

【背景】オンライン血液透析濾過（O-HDF）は近年日本における主流の治療法となっている。O-HDF は血液透析（HD）と比較して高い物質除去性能を有しており、血液透析患者の死亡リスクを大幅に低減している。一方で、その物質除去性能が高いが故に生体にとって重要な栄養素であるアルブミン（Alb、分子量 66,000）や他の蛋白質も除去されてしまうという問題がある。アンチトロンビン（AT）は肝臓で合成される血液凝固阻止因子で分子量約 58,000 の蛋白質である。つまり、O-HDF では AT が除去されてしまう可能性がある。以前の研究結果から血液透析患者は AT 活性が低下していることが判明している。AT 欠乏症の臨床検査に関するガイドラインによると、後天性の AT 活性低下の原因として肝合成能低下、血液凝固による消費亢進、尿中への漏出、ヘパリンの使用、体液過剰による希釈などが挙げられている。しかし、これまで血液透析患者の AT 活性低下の原因に対して、血液透析治療による漏出と透析膜への吸着に関する検討はされていない。

【本研究の目的】本研究は、血液透析治療方法の違いによる AT 漏出量の測定、透析膜への AT 吸着量を測定し、AT 活性低下の原因について究明することを目的とした。また血液透析患者の AT 活性低下が血栓傾向に影響しているのか解析を行った。

研究の方法

(1) O-HDF による AT 漏出と AT 活性低下への影響に関する解析

板谷医院で維持透析を施行中の血液透析患者 24 名（HD12 名、O-HDF12 名）を対象に、透析前後血漿を採取した。測定項目は AT 活性、AT 抗原量、Alb、 $\alpha 1$ ミクログロブリン（MG）、 $\beta 2$ MG、可溶性フィブリン（SF）、D-dimer、ヘマトクリット値（Ht）。また、透析中は連続的に透析液廃液を採取し、廃液中の Alb、AT 抗原量を測定した。透析前後の AT 抗原量、Alb、 $\alpha 1$ MG、 $\beta 2$ MG から Ht 補正した除去率を算出し、透析液廃液中の AT 抗原量との関連性を解析した。さらに透析前後の AT 活性/抗原比を算出して透析治療による AT への影響について解析を行った。

(2) 透析膜への AT 吸着量の解析

使用後透析膜（HD 用 FX 膜、HDF 用 ABH-LA 膜）のハウジングを切断後、血液入口側 A 側、出口側の V 側に分けて中空糸を採取した。中空糸はクライオスタットを用いて凍結切片とし、0.6 mL マイクロチューブ内で AT を標的に免疫蛍光染色を行なった。作製した標本はオールインワン蛍光顕微鏡（キーエンス）で撮影した後、任意の 3 点の AT の輝度を測定し吸着量を半定量化した。

【研究成果】

(1) HDF による AT 漏出と AT 活性低下への影響に関する解析

透析治療方法による AT 漏出量は、HD : 0.7 ± 0.7 mg/session、O-HDF : 35.3 ± 29.8 mg/session と O-HDF で有意に多かった ($p < 0.001$)。特に FIX-S 膜を使用した O-HDF で AT 漏出量が顕著に多かった (50.7 ± 24.0 mg/session)。しかし、AT 漏出量と透析前後の AT 活性との間に相関関係は認められなかった (透析前 : $p = 0.581$, $R = -0.119$, 透析後 : $p = 0.153$, $R = -0.301$)。

AT 漏出量と $\alpha 1$ MG 除去率、 $\beta 2$ MG 除去率との関係性を解析すると、 $\alpha 1$ MG 除去率が 25%以上、 $\beta 2$ MG 除去率が 70%以上から AT 漏出量が急激に増加していた。この AT 漏出特性は Alb 漏出特性と酷似しており、両者には強い正の相関を認めた ($p < 0.001$, $R = 0.920$)。以上の結果から、AT 漏出は Alb 漏出量を抑えた HD 療法、もしくは Alb 漏出量を抑えたヘモダイアフィルターを使用した O-HDF を行うことで抑制することができると明らかとなった。さらに、定期的な血液検査で測定される $\alpha 1$ MG、 $\beta 2$ MG から AT 漏出量が予測可能なことが示唆され、透析治療条件の検討に有用な情報となる。

透析による AT 活性への影響を解析するために、透析前後の AT 活性/抗原比を算出した。透析前 : 2.95 ± 0.21 、透析後 : 3.21 ± 0.18 と有意に AT 活性/抗原比が上昇 ($p < 0.001$, Effect size 0.611) しており、透析後には健常者 : 3.07 ± 0.17 と同等以上まで上昇していた。透析治療による除水を行うことで AT が濃縮されるが、それ以上に AT 活性が上昇していたこととなる。この AT 活性の変化については今後追加検討する予定である。

(2) 血液透析患者の AT 活性低下と血栓傾向との関係

血液透析患者の AT 活性低下が血栓傾向に関連するかを調べるために可溶性フィブリン (SF) と D-dimer の測定を行った。透析前後の AT 活性と SF ($p = 0.073$, $R = -0.373$, and $p = 0.563$, $R = -0.124$, respectively)、D-dimer ($p = 0.409$, $R = -0.177$, and $p = 0.075$, $R = -0.370$, respectively) に相関関係は認めず、AT 活性が低下したとしても血栓傾向にあるとはいえなかった。また、臨床症状でも研究対象者に血栓を疑う所見は認められなかった。

(3) 透析治療方法の違いによる透析膜への AT 吸着

HD 療法 (FX 膜)、O-HDF 療法 (ABH-LA 膜) で使用した透析膜を、抗 AT 抗体を用いて免疫蛍光染色し、透析膜内の輝度を測定した。FX 膜の輝度の合計は A 側 : $2.8 \pm 0.3 \times 10^6$ 、V 側 : $6.9 \pm 3.4 \times 10^6$ 、ABH-LA 膜の輝度の合計は A 側 : $5.3 \pm 1.3 \times 10^6$ 、V 側 : $4.6 \pm 0.5 \times 10^6$ であった。FX 膜では V 側の AT 吸着量が多い結果となったが、これは透析膜内部の圧力勾配とは反する結果となった。透析治療方法における AT 吸着量 (輝度) に有意な差は認められなかった ($p = 0.744$)。

本研究結果から、O-HDF では膜の種類によってある程度 AT が漏出することが判明したが、AT 活性低下への影響は明らかとならなかった。しかし、AT が漏出していることは事実であり、AT 活性が低下した症例では AT 漏出を抑制した条件で透析治療を行う必要がある。また、透析患者に頻回に合併するバスキュラーアクセス関連血栓症は、AT 欠乏症をはじめとする血栓性素因が複合化することでリスクが増大すると報告されている。つまり血栓症リスクのある患者では、AT 活性に関わらず、AT 漏出が抑制できる透析条件を選択すべきである。

【今後の展望】

本研究では透析治療後に AT 活性/抗原比が上昇していた。この原因として、①透析治療によって AT に何らかの影響を与えたのか、②AT 測定過程において何らかの物質が AT 測定を阻害していたのか、などが考えられるが本研究では明らかとされていない。今後は透析治療による AT 活性/抗原比上昇のメカニズムについて解析を行う予定である。透析膜の免疫蛍光染色はマイクロチューブを用いた浮遊染色法で行なっている。今後はスライドグラス上での染色を検討する必要があるため、メーカーと共同で透析膜染色用のスライドグラスコーティングを検討する予定である。

【引用文献】

- ・ Blankestijn PJ, Vernooij RWM, Hockham C, Strippoli GFM, Canaud B, et al. Effect of Hemodiafiltration or Hemodialysis on Mortality in Kidney Failure. N Engl J Med. 2023 Aug 24;389(8):700-709.
- ・ Van Cott EM, Orlando C, Moore GW, Cooper PC, Meijer P, et al. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2020 Jan;18(1):17-22.

主な発表論文等	論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい。
<学会発表>	
・第69回日本透析医学会学術集会（口頭発表/2024.6）	
・第46回日本血栓止血学会学術集会（口頭発表/2024.6）	

経費

費目別内訳	消耗品費	旅費	備品費	その他	計
	408,584	136,880	0	454,110	999,574

主な備品の内訳(1品又は1組もしくは1式の価格が10万円以上のもの)

品名	仕様	数量	単価	金額	納期
					年 月
					年 月
					年 月

組織

分担・協力者	氏名	所属・職位	役割
分担者	森下 英理子	金沢大学・教授	論文作成指導
分担者	長屋 聡美	金沢大学・助教	データ解析、論文作成補助
協力者	瀬尾 篤宣	板谷医院・技士長	患者情報収集、検体採取