

原著論文

組織修復, 再生を考慮した新たな血液浄化療法の試み

長屋 昌樹^{*1}・窪田 倭^{*2}・清水 徹^{*3}・大内 崇弘^{*1}・星名 聖剛^{*1}
平 泰彦^{*1}・明石 勝也^{*1}

^{*1}聖マリアンナ医科大学救急医学, ^{*2}同一般外科, ^{*3}臨床工学技師

A Clinical Trial of a New Blood Purification Treatment, "Extended-HDF," in Consideration of Cytokines in Relation to Wound Healing

Masaki Nagaya^{*1}, Sunao Kubota^{*2}, Toru Shimizu^{*3}, Takahiro Ohuchi^{*1}, Seigou Hoishina^{*1}, Yasuhiko Taira^{*1} and Katsuya Akashi^{*1}

^{*1}Department of Emergency Critical Care Medicine, ^{*2}Department of General Surgery, and

^{*3}Department of Clinical Engineering, St. Marianna University School of Medicine

Summary We have developed an "extended-HDF" treatment, which is carried out intermediately with 8 hr hemodiafiltration during the daytime and 16 hr rest at night. The reason of performing only 8 hr of hemodiafiltration during the daytime is as follows: Circadian rhythm exists in organisms and wound healing occurs at night. Cytokines may play an important role in the wound healing and regeneration process, while on the other hand, CHDF removes almost all of the cytokines. Therefore, it would not be the best method for wound healing and regeneration if all the cytokines were absorbed. Cytokines can induce growth factors and activate extracellular matrix during the 16 hr of resting phase of extended-HDF at night. We performed this treatment on five patients who had traumatic injuries or were operated on. TNF- α , IL-6, VEGF and HGF were analyzed to evaluate the efficacy of the procedure in those patients. In the evaluation of this procedure, the plasma concentrations of TNF- α and IL-6 were significantly decreased after extended-HDF. Furthermore, the level of TNF- α and IL-6 increased during the resting phase, however, there was no significance in the statistics analysis. The plasma HGF was not significantly changed. Therefore, extended-HDF is suggested as a new procedure for blood purification treatment that is acceptable for patients.

Key words: blood purification treatment, extended-HDF, cytokine, wound healing, growth factor, circadian rhythm

要 旨 これまで炎症性サイトカインが生命予後に影響しており血液浄化療法によるこれらの除去について論議されてきた。しかし、近年、Interleukin-1 (以下 IL-1) や Interleukin-6 (以下 IL-6) は創傷治癒、組織再生時の増殖因子 (サイトカイン) を誘導することが判明した。また増殖因子、細胞外マトリックスは創傷治癒、組織再生に重要な役割を果たすことが解ってきている。一方、生体にはサーカディアンリズム (日概リズム) が存在し、創傷治癒は夜間に起こることが解明された。著者らはこれを考慮し、組織修復、再生時に有効にサイトカインを利用できる新たな血液浄化療法として、Continuous hemodiafiltration (以下 CHDF) を modify した日中 8 時間施行、夜間 16 時間休止を繰り返す間歇的 Hemodiafiltration (以下 HDF) である "extended-HDF" を考案した。今回、著者らは当科で経験した外傷及び手術例 5 例を対象に "extended-HDF" の有用性について retrospective に臨床的検討を行った。また血中 Tumor necrotic factor- α (以下 TNF- α)、IL-6、Vascular endothelial growth factor (以下 VEGF)、Hepatocyte growth factor (以下 HGF) を効果の指標とした。その結果、IL-6 は、5 例中 1 例のみ夜間に上昇を認めたが他の 4 例ではいずれも漸減した。HGF は extended-HDF による影響を受けなかった。TNF- α 、VEGF は施行中に低下、休止期間には上昇した。またクリアランスに有意差は認められなかった。減少率では TNF- α 、VEGF 値は施行中有意に低下、上昇率は VEGF は休止期で有意に上昇し、血液浄化療法の影響を受けることが判明した。以上より、創傷治癒、組織再生に関するサイトカインは HGF を除いたすべてが血液浄化療法の影響を受けることが明らかになった。本法はサーカディアンリズムを考慮し、創傷治癒が最も促進されと考えられる夜間に増殖因子を有効利用できる新たな血液浄化療法であると考えられた。

2002 年 7 月 30 日受付, 2002 年 10 月 28 日受理.

1. はじめに

炎症性サイトカイン特に IL-6 は患者の重症化の病態生理に深く関与し¹⁾, IL-6 の除去が生命予後を改善するという前提のもと, CHDF を用いた humoral mediator 除去の有効性が報告されてきた²⁾. ところが近年 IL-6 は組織修復, 特に組織再生初期の再生信号経路に極めて重要であり, 急性期の蛋白合成に重要な役割を担うとともに, 創傷治癒, 組織再生に関与する HGF とも深い関係を持つことが報告されている^{3,4)}.

一方, ヒトには外傷, 手術により傷害を受けた組織, 臓器を修復, 再生させる能力が備わっている. なかでも VEGF, HGF などの増殖因子は, 創傷治癒, 組織再生時に重要な働きをすることが明らかになってきている⁵⁻⁸⁾.

このようなサイトカインをいかに効率よく利用しうることについては, 生体が持つサーカディアンリズムの関与を考慮に入れることが重要である^{9,10)}. 覚醒のリズムや循環動態の日内変動などの生理現象は視床下部視交叉上核に存在する自立的な体内時計によって制御されており, これをサーカディアンリズムという¹¹⁾. 生物は特定の刺激を受け 24 時間に同調されており, この間に血圧変動をきたす時期, 免疫系の活発になる時期が存在し, 創傷治癒, 組織再生は夜間に起きると考えられている¹²⁾.

これまで著者らは, サーカディアンリズムを考慮した extended-HDF の効果について報告してきたが¹³⁾, 今回は血液浄化療法が創傷治癒, 再生に必要なサイトカインの動態に影響を及ぼすか否かについて検討した.

2. 対象と方法

2002 年 1 月より同年 4 月までに当科に入院した外傷及び手術例 5 例 (男性 4 例, 女性 1 例) を対象に extended-HDF を施行した (表 1). 年齢は 25 から 53 歳, 平均 43.0 ± 11.7 歳であった. 治療効果については血中 TNF- α , IL-6, HGF, VEGF 値を指標とし, extended-HDF の有用性を検討した. 採血は導

入直前, 8, 24, 32, 48, 56 時間後に施行し, 導入直前, 24, 48 時間後の採血は extended-HDF 開始直前, 8, 32, 56 時間後の採血は離脱直前, 開始 2 時間後におけるヘモフィルター前後の 2 ポイントで採血を行った.

2.1 Extended-HDF

Extended-HDF とは 9 時から 17 時までの日中 8 時間のみ CHDF を施行するものである. Extended-HDF の設定はヘモフィルターにトリアセレート膜である UT-700 S ((株)ニプロ, 大阪) を使用し血液流量 100 ml/min, 補液流量 700 ml/hr, 濾液流量 1,000 ml/hr, 透析液流量 300 ml/hr とした. 施行途中での設定変更は行わなかった. 抗凝固剤には Nafamostat Mesilate ((株)鳥居薬品, 東京) を使用し activated coagulation time (ACT) を 180~200 sec に維持するように適宜増減し投与した. また, 透析液にはサブラッド B ((株)扶桑薬品, 大阪), 補液にはヴィーン F ((株)日研科学, 東京) を使用した.

2.2 ヘモフィルターの選定

当初著者らは, polymethyl methacrylate (PMMA) 膜を使用していたが, チャンバーやヘモフィルターにおける血液凝固が頻発した. ACT を定期的に測定し 180~250 sec にコントロールしていたにもかかわらず血液凝固が発生したため, ヘモフィルターの抗凝固性に問題があると判断し UT-700 S に変更した.

2.3 指標としての VEGF, HGF の選択

創傷治癒に関与するサイトカインを表 2 に示す^{14,15)}. VEGF, HGF は創傷治癒に働くサイトカインの中で解明が進んでいる増殖因子である. VEGF は分子量 42 kD で今回使用の UT-700 S でふりい曲線上除去される可能性を持ち, 他のサイトカインでは HGF を除きすべて VEGF より分子量が小さいことが選択理由の一つである. HGF は 69 kD のクリンクル構造を持つ α 鎖と, 34 kD のセリンプロテアーゼ構造を持つ β 鎖と 2 つの糖鎖を有しており, HGF を用いた遺伝子治療など¹⁶⁾, すでに臨床応用され始めているサイトカ

表 1 Extended-HDF を施行した外傷及び手術例 5 例

症例	年齢/性別	病名	手術の有無
1	25/F	急性硬膜下血腫, 肝損傷 (I b), 肺損傷 (IIa), 腎損傷 (IIIc), 骨盤骨折	+
2	48/M	特発性食道破裂	+
3	33/M	脾損傷 (IIIb)	+
4	53/M	脾損傷 (II), 多発肋骨骨折	-
5	53/M	肺損傷 (IIa), 膝蓋骨骨折, 多発肋骨骨折	+

表2 創傷治癒に関するサイトカインとその作用 (外科治療, 1996, 74, 649-658; 救急医学, 2000, 24, 1595-1598 より引用)

名称	作用	分子量 (kD)
PDGF (platelet derived growth factor)	線維芽細胞の増生, 白血球の活性化	12.2~28.5
TGF- α (transforming growth factor- α)	上皮細胞の刺激, 線維芽細胞の増生, 肉芽形成	0.6
EGF (epidermal growth factor)	上皮細胞の刺激, 線維芽細胞の増生, 肉芽形成	28~33
TGF- β (transforming growth factor- β)	線維芽細胞の増生, コラーゲン活性, 血管新生	25
IL-1,2 (Interleukin-1,-2)	線維芽細胞の増生	IL-1 15~17 IL-2 14~17
TNF (tumor necrosis factor)	線維芽細胞の増生	17
FBF (fibroblast growth factor)	上皮細胞の増生, 線維芽細胞の増生, 創収縮, 血管新生	15.2~15.8
KGF (keratinocyte growth factor)	上皮細胞の増生	18.9
IGF-1 (Insulin growth factor-1)	プリテオグリカンの合成, 線維芽細胞の増生	7.6
INF (Interferon)	線維芽細胞の増生, コラーゲン合成の抑制	20
VEGF (vascular endothelial growth factor)	血管内皮細胞の増殖, 内皮の遊走促進, 血管新生	42
HGF (hepatocyte growth factor)	様々な細胞に対して増殖促進, 血管新生 上皮細胞の増生, 形体誘導, 抗アポトーシス作用	α 鎖 69, β 鎖 34

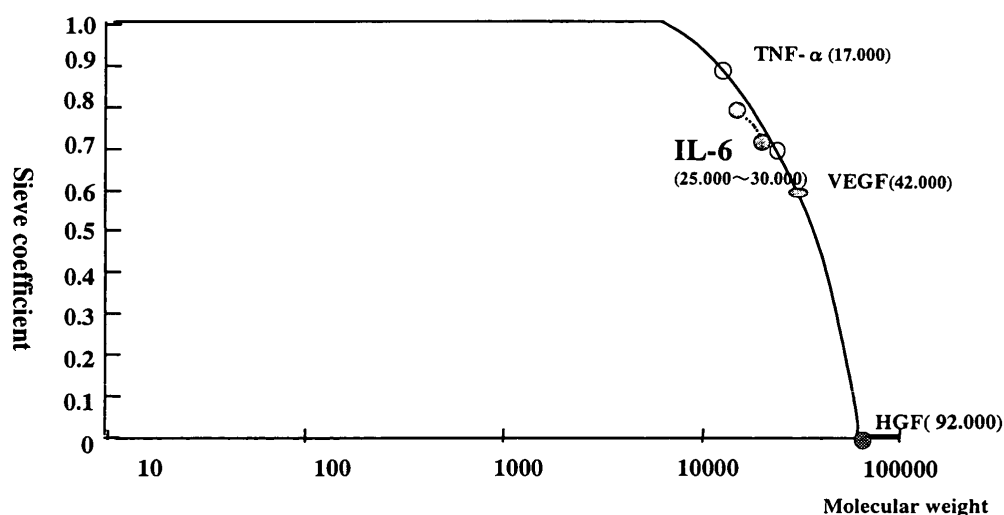


図1 UT-700 Sにおけるふるい係数曲線 ((株)ニプロ: UT フィルターカタログより引用)

インの一つで, 分子量 92 kD と唯一除去されない可能性を持つため指標として選択した (図1)。

2.4 サーカディアンリズム

日中, 夜間に鎮静剤を適正使用することによりサーカディアンリズムを損なわないという McLeod ら¹⁷⁾, 布宮ら¹⁸⁾の報告に準じた。これは, 鎮静効果の指標となる Ramsey の sedation score において, 日中は SS 2~4, 夜間は SS 4~5 にコントロールすることによりサーカディアンリズムを保つことが可能であるというものである。日中, ミダゾラム ((株)山之内, 東京) を用い SS 2~4 に, 夜間, 入眠困難な患者にはプロポフォール ((株)アストラゼネカ, 東京) を追加し SS 4~5 にコントロールした。

統計学的有意差検定には, 従属のある t 検定を用い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結 果

Extended-HDF 施行3日間における TNF- α , IL-6, VEGF, HGF の経時的变化では, IL-6 が症例2の1例のみ day 0 の休止期間に 1,970 pg/ml から 2,810 pg/ml と上昇を認めたものの, その他の症例では漸減した。

TNF- α , VEGF は施行中に減少, 休止期は上昇する傾向を示した。HGF は, 3例で32時間~48時間にピークを認めたが extended-HDF 施行による影響は認めなかった (図2)。Extended-HDF 施行前後における推移では, 各個体間でのばらつきがあるため, いずれも施行直前の値を 100% とし, 比で表した後, 減少率を算出した。いずれも平均で TNF- α 31%, IL-6 30%, VEGF 39% の減少を認め, extended-HDF においても TNF- α , IL-6 を有意に低下させる

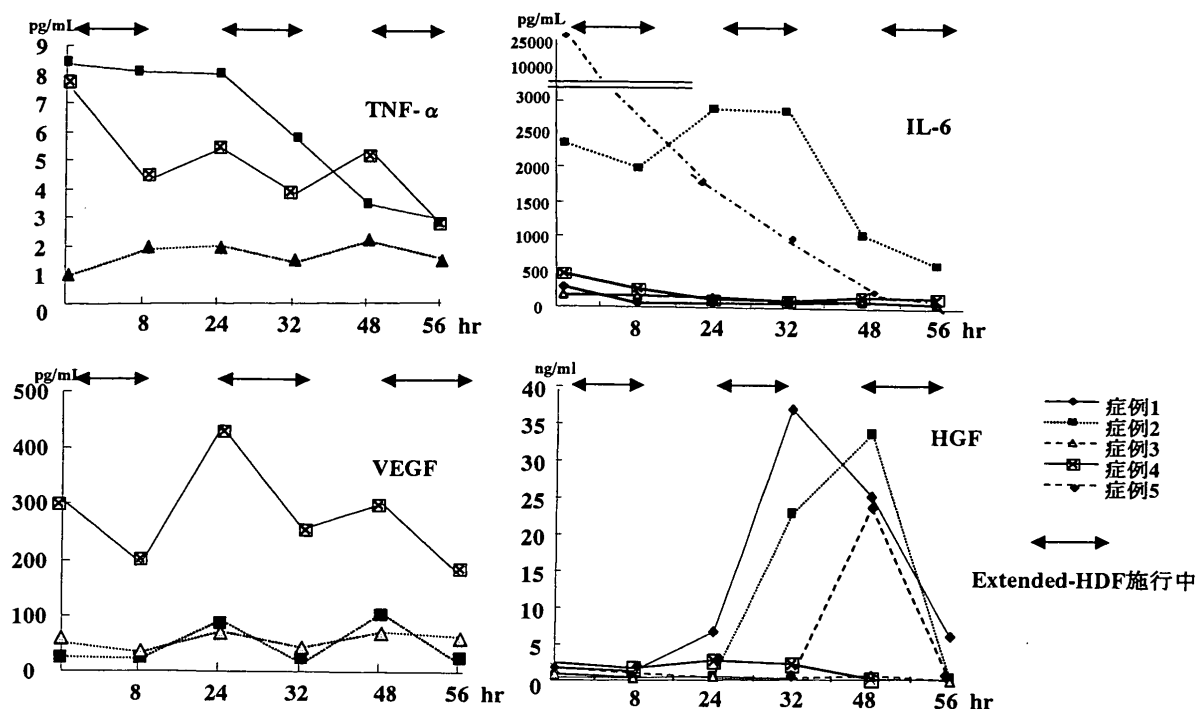


図2 Extended-HDF 施行中における3日間でのTNF- α , IL-6, VEGF, HGFの変化

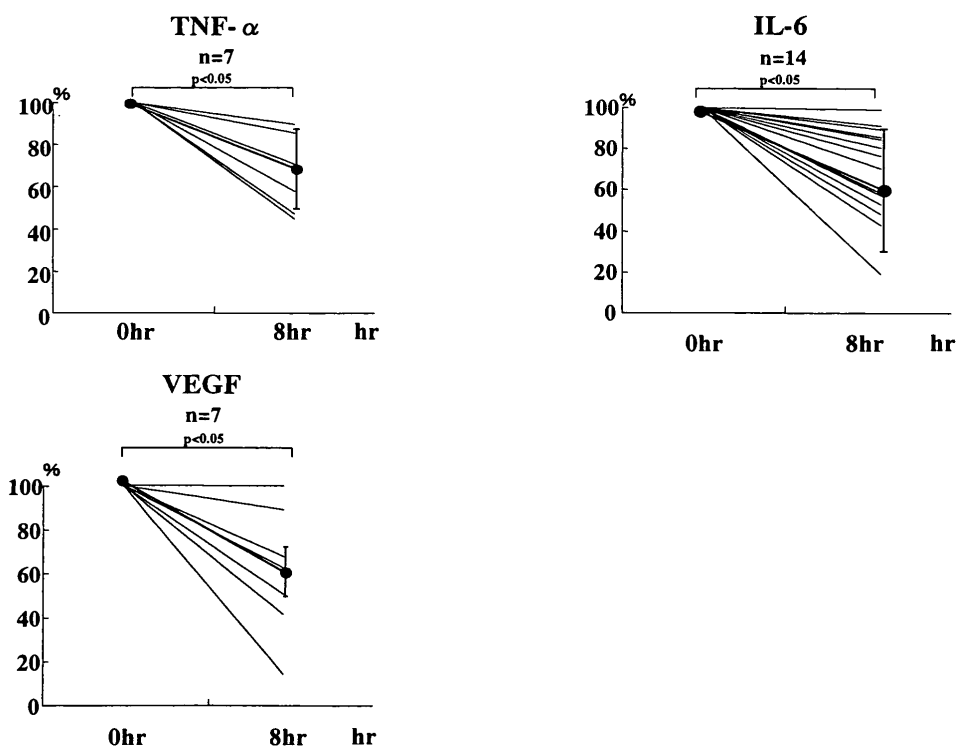


図3 Extended-HDF 施行前後におけるTNF- α , IL-6, VEGF 値の推移

ことが可能であった ($p < 0.05$) (図3)。また, extended-HDF 直後の値を基準値 (100%) とし, 同様に上昇率を算出した。平均でTNF- α 115%, VEGF 221%の上昇を認めた。特に VEGF おいては有意に上昇した ($p < 0.05$)。

Extended-HDF 施行中のヘモフィルター前後では, TNF- α は 12.41 ± 8.57 pg/ml から 8.25 ± 6.51 pg/ml へ, IL-6 は $1,490.30 \pm 1,220.70$ pg/ml から $1,292.38 \pm 1,135.317$ pg/ml へ, VEGF は 175.23 ± 123.02 pg/ml から 105.90 ± 89.01 pg/ml へと低下し

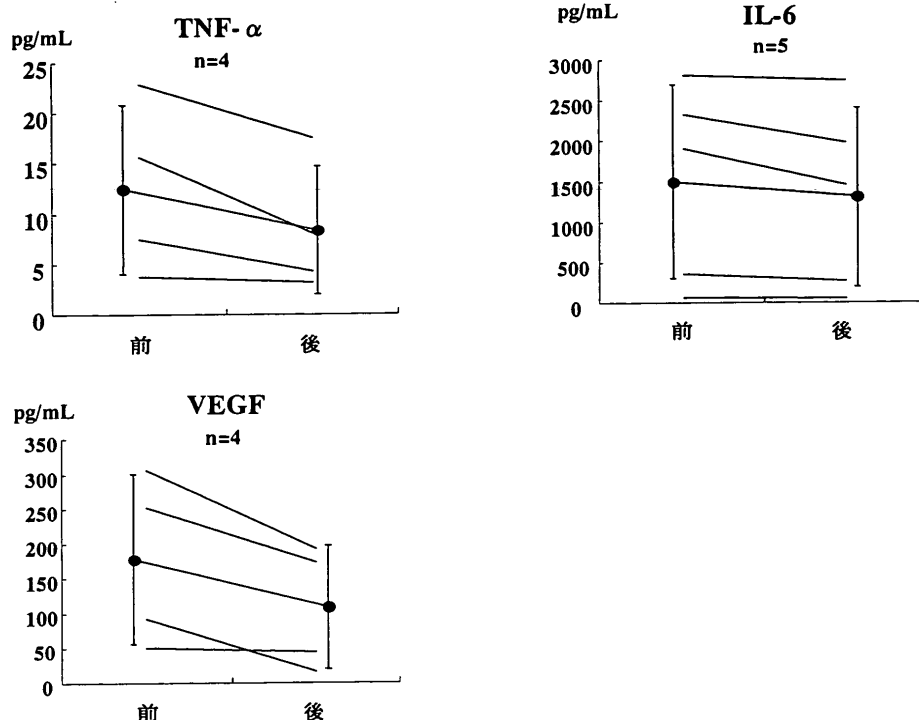


図4 ヘモフィルター前後における TNF- α 、IL-6、VEGF 値の推移

たが、有意差は認められなかった (図4)。クリアランスは TNF- α 33.50 ml/min, IL-6 13.28 ml/min, VEGF 39.56 ml/min, HGF 24.39 ml/min であった。

4. 考 察

生命予後に影響を及ぼすと考えられている炎症性サイトカインを血液浄化療法により除去するという考え方は治療戦略の一つとなりつつある^{2,19,20}。外傷や外科的侵襲は炎症性サイトカインをいちじるしく上昇させる為、これらに対して血液浄化療法は有効な治療手段と考えられる。

しかしながら近年、IL-6 が組織修復、特に組織再生の初期の再生信号経路に極めて重要であることが解明され、上皮架橋形成、肉芽組織形成、さらには肝再生、肝障害防止に重要な役割を果たすことが明らかとなった^{4,21}。

IL-6 がレセプターに結合すると、チロシンキナーゼが活性化され signal transducers and activators of transcription 3 (STAT 3) をリン酸化し、STAT 3 が標的遺伝子である serum inducible element (SIE) に結合することにより転写酵素の活性化が起き組織再生が始まる。IL-6 が欠損するとこの STAT 3 の転写酵素の活性化は起きないために組織は再生しないというものである (図5)²²。つまり IL-

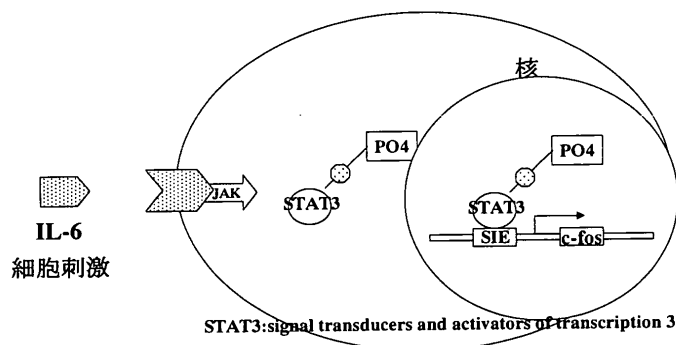


図5 STAT 3 の活性化機構

JAK: Janus キナーゼ, SIE: serum inducible element (FASEB J, 1996, 10, 413-427 より引用)。

6 は創傷治癒における伝達信号と考えられている。

一方、増殖因子である VEGF は炎症細胞の損傷部位への走化、遊走、血管内皮細胞の増殖と血管新生を促進する働きを有し創傷治癒、組織再生に寄与する²³。VEGF は通常 24 時間まで漸増し、一度低下するもののただちに上昇、4~7 日目にピークをむかえるが 24 時間以降に低下することはない^{24~26}。しかしながら、著者らの結果が示すように extended-HDF 施行中は低下、休止期は上昇するほか、減少率 39%、クリアランス 39.56 ml/min と明らかに血液浄化療法の影響を受けていると考えられる。

創傷治癒形式は 1) 炎症期、2) 肉芽形成期、3) 癒

痕期の3期に分けられる^{14,15)}。外傷、手術例においては受傷直後もしくは4～5日目までに血液浄化療法を施行することとなるが、炎症期であるこの時期はサイトカインが最も必要な時期であるにもかかわらず、血液浄化療法はこれらに影響を及ぼし、創傷治癒を考慮した場合IL-6、VEGFのCHDFによる持続的な除去は推奨できないことになる。

細胞、増殖因子、細胞外マトリックスは創傷治癒、組織再生に不可欠であるが²⁷⁾、VEGFが血液浄化療法に影響を受けたことより、増殖因子、細胞外マトリックスにまつわるHGFを除くすべてのサイトカインが血液浄化療法によって除去される可能性が強く示唆された(表2)。

また、創傷治癒、組織再生は、血液が上皮再生や線維芽細胞の増殖に関与するサイトカイン、血液凝固因子、血小板、生体防御系の働きをつかさどるマクロファージ、リンパ球などを各組織に運ぶことにより成り立つ。生体では日中交感神経系が優位となる。すなわち血中カテコラミン値は日中に高く、交感神経系の過剰な緊張の持続が細動脈を収縮させ、全身のすべての部位での血液量低下をきたし、顆粒球は内皮細胞に障害を与え活性酸素を発生させる。夜間は副交感神経系が優位となり、副交感神経刺激による血液量の増加とリンパ球増多が起こる。これが組織修復、再生のサーカディアンリズムである¹²⁾。近年、サーカディアンリズムの研究が進み、集中治療室:intensive care unit(以下ICU)入院患者においても、鎮静剤を効果的に使用することによりサーカディアンリズムを損なわないとする報告がなされている²⁸⁻³⁰⁾。現在、著者らはICU患者が最も日常生活のリズムに近い状態を保つ方法を検討中である。

著者らの結果が示すようにextended-HDFはサーカディアンリズムを考慮し、創傷治癒、組織再生に必要なサイトカインを夜間に利用する新たな血液浄化療法である。今後は、本法とCHDFとに治療成績に差が生じるかについても検討を考慮したい。

文 献

- 1) 松田兼一, 平澤博之, 織田成人, 他: Cytokine 血中濃度迅速測定. 救急医学 25: 847-853, 2001
- 2) 北村伸哉, 平澤博之, 織田成人, 他: 重症急性膵炎におけるCHDFによる臓器不全対策とIL-6血中濃度測定の有用性. ICUとCCU 25: S 68-S 70, 2001
- 3) Michalopoulos GK, DeFrances MC: Liver regeneration. Science 276: 60-66, 1997
- 4) Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, et al:

- Liver failure and defective hepatocyte regeneration in IL-6-deficient mice. Science 274: 1377-1383, 1996
- 5) Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. EX 79: 233-269, 1997
- 6) Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 18: 4-25, 1997
- 7) 谷口英太郎, 向坂彰太郎, 古賀浩徳, 他: 再生肝における増殖期類洞内皮細胞の肝小葉内分布の検討. 薬理と治療 27: S 1515-1517, 1999
- 8) Roman CD, Choy H, Nanney L, et al: Vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis inhibition and postoperative wound healing in rats. J Surg Res 105: 43-47, 2002
- 9) Halberg F, Good RA, Levine H: Some aspects of the cardiovascular and renal circadian system. Circulation 34: 715-717, 1966
- 10) Halberg F, Stephens AN: Susceptibility to ouabian and physiologic circadian periodicity. Proc Minn Acad Sci 27: 139-143, 1959
- 11) 布宮 伸, 丹野 英, 窪田達也: ICUにおける日内変動をつけた鎮静法と血清メラトニンの変動. ICUとCCU 24: 407-412, 2000
- 12) 安保 徹: サーカディアンリズムと創傷治癒. Biomed Perspect 9: 208-213, 2000
- 13) 長屋昌樹, 清水 徹, 三原良孝, 他: 外傷性膵損傷手術症例に対するCHDFの使用経験. ICUとCCU 26: S 78-S 80, 2002
- 14) 下村一之, 出月康夫: 創傷治癒のメカニズムと管理. 外科治療 74: 649-658, 1996
- 15) 竹原和彦: 増殖因子の臨床応用. 救急医学 24: 1599-1603, 2000
- 16) 植木孝浩, 藤本治朗: HGFによる肝硬変の遺伝子治療. 日アフレスシス会誌 21: 122-126, 2002
- 17) McLeod G, Wallis C, Dick J, et al: Use of 2% propofol of procedure diurnal sedation in critically ill patients. Intensive Care Med 23: 428-434, 1997
- 18) 布宮 伸, 丹野 英, 窪田達也: ICUにおける日内変動をつけた鎮静法と血清メラトニンの変動. ICUとCCU 24: 407-412, 2000
- 19) 北村伸哉, 平澤博之, 菅井桂雄, 他: 重症患者管理におけるcontinuous hemodiafiltration (CHDF)の臨床効果. 日アフレスシス会誌 18: 35-40, 1999
- 20) 貞広智仁, 平澤博之, 菅井桂雄, 他: Critical careにおけるCHDFのcytokine除去効果及びその機序について. 日アフレスシス会誌 18: 41-47, 1999
- 21) Taub R: Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. FASEB J 10: 413-427, 1996
- 22) Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, et al: Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. FASEB J 15: 2525-2531, 2000
- 23) Bennett NT, Schultz GS: Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. Am J Surg 165: 728-737, 1993
- 24) 矢口有乃, 石川雅健, 曾我幸弘, 他: 多臓器傷害(MODS)症例における血管新生因子の経時的変化と予後についての検討. 東大医大誌 68: 249-257, 1998
- 25) Frank S, Hubner G, Breier G, et al: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cul-

- tured keratinocytes. J Biol Chem **270** : 12607-12613, 1995
- 26) Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al: Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol **152** : 1445-1452, 1998
- 27) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. Science **260** : 920-926, 1993
- 28) 妙中信之, 西村信哉 : ICU 患者の QOL を考慮した鎮静と睡眠. ICU と CCU **24** : 413-420, 2000
- 29) 大川匡子 : 概日リズムと睡眠障害—ICU 患者への治療のアプローチ. ICU と CCU **24** : 389-397, 2000
- 30) 大塚邦明, 須田優司 : ICU 患者の循環に及ぼす概日リズムの影響. ICU と CCU **24** : 399-405, 2000
- 別刷請求先 : 〒 216-0015 川崎市宮前区菅生 2-16-1 聖マリアンナ医科大学救急医学 長屋昌樹