

# 新しい「人工腎臓」の開発の現状

—細胞使用・不使用を含めて—

斎藤 明

湘南東部総合病院腎臓内科・透析センター

key words：人工腎臓，装着型人工腎，バイオ人工尿細管，尿細管機能，血液透析

## 要 旨

新しい人工腎臓として今後開発されるべきものは少なくない。しかし、既存の技術で実現でき、現状の改良となるものではなく、現行透析技術では実現できない機能をもつものに注目したい。持続装着型血液濾過や尿細管の代謝、内分泌機能を付加されたものは、現行の透析技術効率を著しく向上させるのみならず、現行治療で生じる多くの合併症の発症や進展を防止する可能性が高い。本稿では、その取り組みの現況について詳述する。

## はじめに

国単位の透析患者調査において、10年以上の生存率が報告されているのは我が国のみであり、国際的な生存率を比較することは不可能である。しかし、国際的な前向き観察研究である DOPPS の結果から、わが国の血液透析（HD）患者の生命予後をみる限り、国際的に突出した到達点に至っている。これは、我が国 HD 患者にとり好ましい結果であるが、他方で、透析で長期生存し、高齢化するが故に重篤な合併症に苦しむことにもなる。また、自立できない患者の増加が、入院・入所施設の不足や医療・福祉費の高騰などの社会的な問題の深刻化をももたらすことになる。

現行の HD 療法が非持続的・非選択的な物質除去治療であり、有用な物質の代謝やビタミン D の活性化などの内分泌機能、そして選択再吸収能をもたない限

り、この問題を解決することは困難と思われる。したがって、現行の透析療法を改善する努力とともに、次のステップとなる人工腎臓の開発を進めることは、患者にとり、また、医療社会的問題の克服のうえで必要なことであろう。

再生医療、とくに iPS 細胞から安全な自己（または他家）細胞・組織・臓器への分化、作製が進むことにより、臓器不全にともなう医療に著しい変化がもたらされることになるが、安全性が完全に担保され、実臨床に応用可能になるには、未だ10年から20年の研究の持続が必要であろう。仮に、20年後にその技術が確立されたとしても、それから移植医を養成し、現在実施されている1年間に約1,600例の腎臓移植が5,000例に増えたとしても、10年間で5万例の移植がなされることになり、実在の30万人強の全透析患者が移植を受けるには60余年かかることになる。より多数の移植医養成により早まることもありうるが、待機患者移植後の大量失業も考慮すると、それほど増やすことにはリスクが大きい。今後も長きにわたって HD を始めとする人工腎臓が必要とされることになる。

ここでは、

- ① 現行の間歇的血液透析から持続濾過への発展
- ② 代謝・内分泌機能付加型（細胞使用型）人工腎臓
- ③ 細胞非使用選択的再吸収（濾過液再生）技術などの開発の現状について述べてみたい。

## 1 持続濾過（装着型）人工腎臓開発の現状

現在の週3回、1回4時間透析は、週12時間（1週間168時間のわずか7.1%）しか働いていない間歇的治療であり、治療効果に限界がある。それを持続治療に替えることにより明らかに効率を上げることができる。しかし、血液透析では大量の透析液を流すシステムが要るので、透析のできる部屋にずっと横たわる必要がある。血液濾過器により患者から得られた濾過液を再生し再循環できれば、持続治療には濾過法を用い、装着する治療を行うことになる。

Guraらは、持続血液濾過器、血液回路、ヘパリン注入器、吸着筒、蓄電池、気泡検出器、排液バッグなどの装置を装着する装着型人工腎臓を開発し、まずは心不全発作を防止するために、心不全を合併する透析患者の透析から透析までの間の一時的な水分除去を主目的とした装着濾過治療を行った<sup>1,2)</sup>。それは、排液バッグに濾過液を溜め、廃棄するものであった。その後、多臓器不全などの救命のための急性血液浄化法としても使用されている。24時間血液ポンプ、濾過液ポンプを回転できるバッテリーが開発されたことにより、これらの治療が可能になった。現在、臨床治験を開始しており、短期間交換型の装着システムとして数年内での認可が期待されるが、維持透析患者のためにそれ以上に装着時間を延ばすには、ヘパリンの長期持続使用を必要としないか、激減させる抗血栓性持続血

液濾過器の開発が必要になる。

本邦において小久保、松田らは<sup>3)</sup>、都市部以外の僻地などで発生する重症急性腎障害患者を、その地域の基幹病院へ移送する前から持続血液濾過治療を開始できるための小型化持続血液濾過システムを開発している。臨床研究は開始されていないが、内径100ミクロンの小型持続血液濾過器と小型血液ポンプを用いた装着移動可能な濾過システムとして期待されている。

## 2 代謝機能付加型人工腎臓

—尿細管上皮細胞使用の場合

ヒト体内の腎臓と同じ尿細管機能を代替させるために、私どもは患者から血液濾過膜により得られた濾過液を、治療上、腎摘を余儀なくされた患者腎から採取したヒト近位尿細管上皮細胞（RPTEC）を用いたバイオ人工尿細管デバイスを用い、濾過液有用物質の再吸収、代謝などを行わせるシステムを開発した。

本システムでは、尿細管デバイス（bioartificial tubule device; BTD）の中空糸膜の内面をRPTECで覆い、中空糸内腔に患者濾過液を、また、外側に患者血液を灌流させ、濾過廃液は廃棄し、血液は患者に戻す治療法である。本システムの尿細管再吸収や有用物質の代謝、内分泌機能などをin vitroなどで評価し<sup>4~19)</sup>、慢性HD患者の合併症の予防や進展防止に用いることを目指した。しかし、透析患者の治療法としての開発研究費を国から得られにくいことが判明し、その前

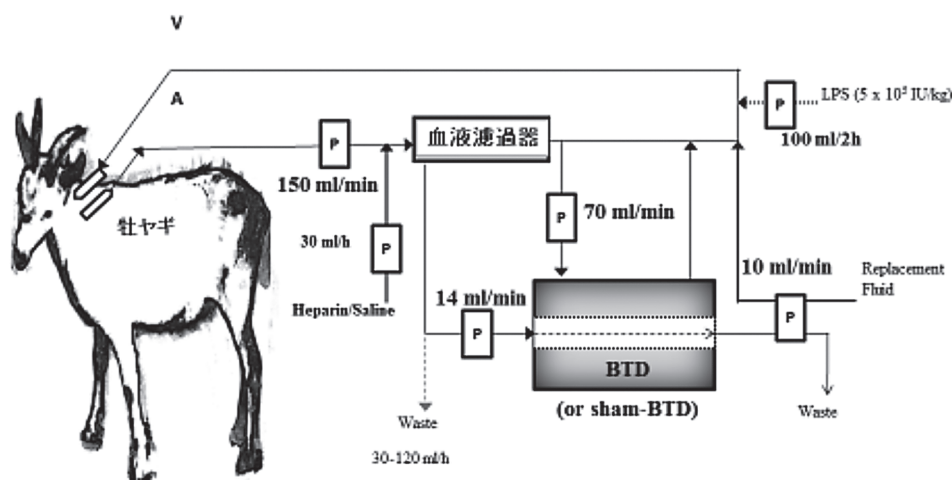


図1 LPS 静注腎不全ヤギのバイオ人工尿細管治療回路図

両腎摘出48時間後に致死量のLPSを静注された牝ヤギ32匹の頸部動静脈にカテーテルを挿入し、150 ml/分の血流を得て血液濾過を実施し、得られた濾過液14 ml/分をヒト尿細管上皮細胞の生着したバイオ人工尿細管デバイスの内腔を灌流させ、血液70 ml/分を外側に灌流させた。治療は24時間実施した。（文献20より）

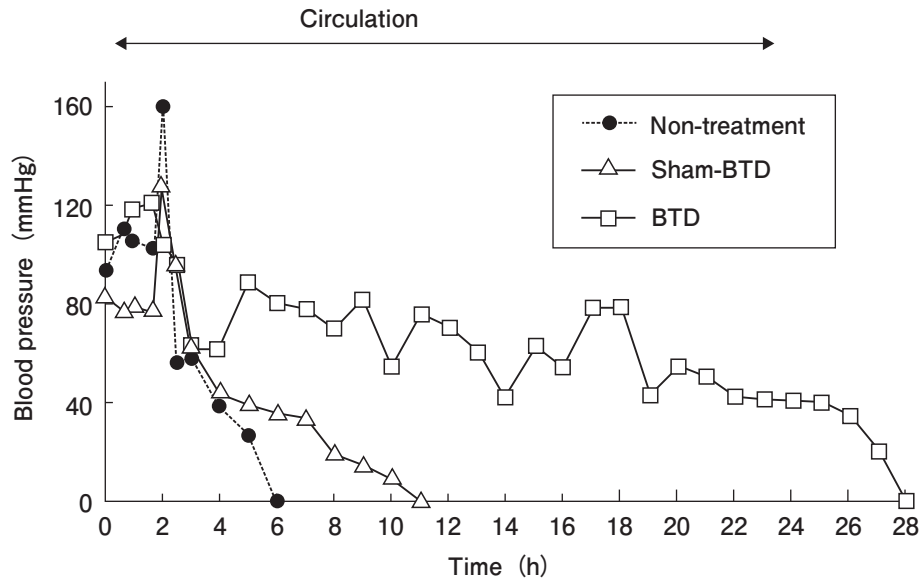


図2 LPS 静注開始後の3群の収縮期血圧の典型的推移

いずれもLPS静注後血圧は急上昇し、その後無治療群では速やかな低下を示し、6時間後に死亡した。Sham-BTD群でも血圧上昇後低下を示し、11時間後に死亡した。BTD群では投与後の血圧上昇は示したが、その後循環治療中は80 mmHg前後で維持され、24時間の治療後4時間で死亡した。(文献20より)

に、全身性炎症反応症候群などから多臓器不全に移行する致死的患者の救命の手段としての治療効果を評価することとした<sup>20)</sup>。すなわち、両腎摘出48時間後に致死量のリポ多糖体(LPS)を静注した約40kgのヤギの24時間にわたるバイオ人工尿管治療を施行し(図1)、ヤギの生存時間、血清IL-6濃度推移、ヤギの末梢血単核球のIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF $\alpha$ 、インターフェロン $\gamma$ などのRT-PCRによるmRNAの発現推移を治療経過で追った。

図2に、LPS静注開始から死亡に至るまでの3群の収縮期血圧の推移の典型例を示した。無治療群では、LPS静注開始後、収縮期血圧が著しく上昇し、その後速い速度で低下し、6時間後に死亡した。Sham-BTD群でも同様に一時的な上昇の後、漸減して11時間後に死亡した。BTD群では、一時的な収縮期血圧上昇後、しばらくヤギの正常収縮期血圧に近い80 mmHg程度で推移したが、BTD治療が終了した24時間後から血圧低下を示し、28時間後に死亡した。直接死因はエンドトキシンショックと考えられた。

24匹の牡ヤギは両腎摘出後致死量のLPSを静注し、無治療で経過を観察した無治療群、患者濾過液をRPTECのないBTDに灌流したSham-BTD群、そして、BTD群の3群、各8例に分けて経過観察した。LPS静注後の各群の生存期間は、無治療群平均5.1時

間、Sham-BTD群平均9.04時間、BTD群24.3時間であり、BTD群は無治療群、Sham-BTD群に比して有意に生存期間が長かった( $P < 0.01$ )。また、血清IL-6値のLPS静注開始後のSham-BTD群、BTD群のそれぞれの典型例の推移を図3(A)に、また、静注開始後6時間に生存したそれぞれSham-BTD、BTD群の血清IL-6値を図3(B)に示した。Sham-BTD群ではLPS静注後の血清IL-6値は漸増し、730 pg/mlを超えた時点で死亡した。一方BTD群では、BTD治療中は400 pg/ml台で推移し、治療終了後500 pg/ml台で死亡している(図4)。LPS静注6時間後に生存したSham-BTD群の平均血清IL-6値は652 pg/ml、また、BTD群のそれは332 pg/mlであり、両者に有意な差を認めた( $p < 0.01$ )。

図5には、ヤギの体外循環治療開始前、開始時(図中2時間目)、LPS静注後(図中4時間目)、6時間目、10時間目のRT-PCRによるIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF $\alpha$ 、インターフェロン(IF) $\gamma$ のmRNA発現率を、Sham-BTD群とBTD群を比較して示した。いずれのサイトカインも、LPS静注前の発現は低く、LPS静注後にも著しく亢進していた。その後の推移は2群で異なり、Sham-BTD群では死亡まで亢進が続いたが、BTD群では治療経過とともにサイトカイン活性は漸減している。これらの結果から、ヤギの血清サイトカ

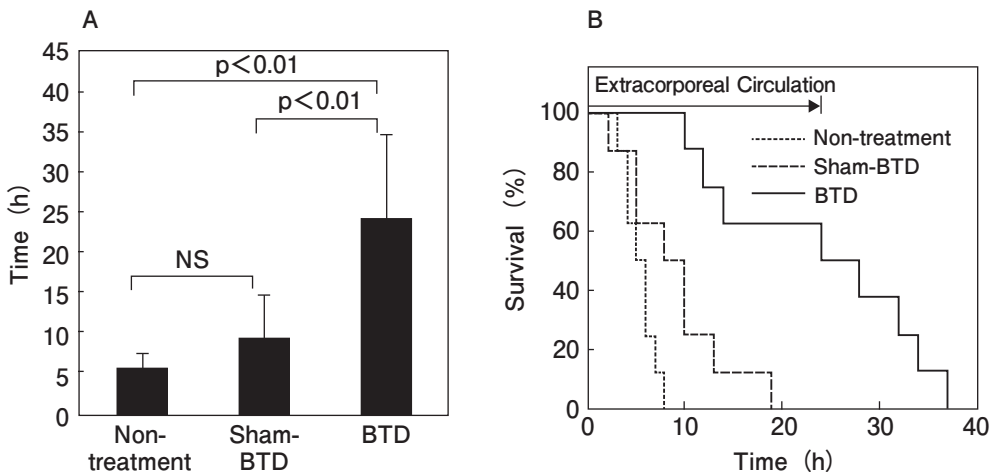


図3 LPS 静注開始後の3群の生存時間 (A) と生存率推移 (B)  
 32匹のヤギを無治療群, 細胞なしデバイス群 (Sham-BTD), 細胞生着デバイス群 (BTD) の各8匹に分けた. 無治療群, Sham-BTD 群に比して BTD 群は有意に長時間生存した. (文献 20 より)

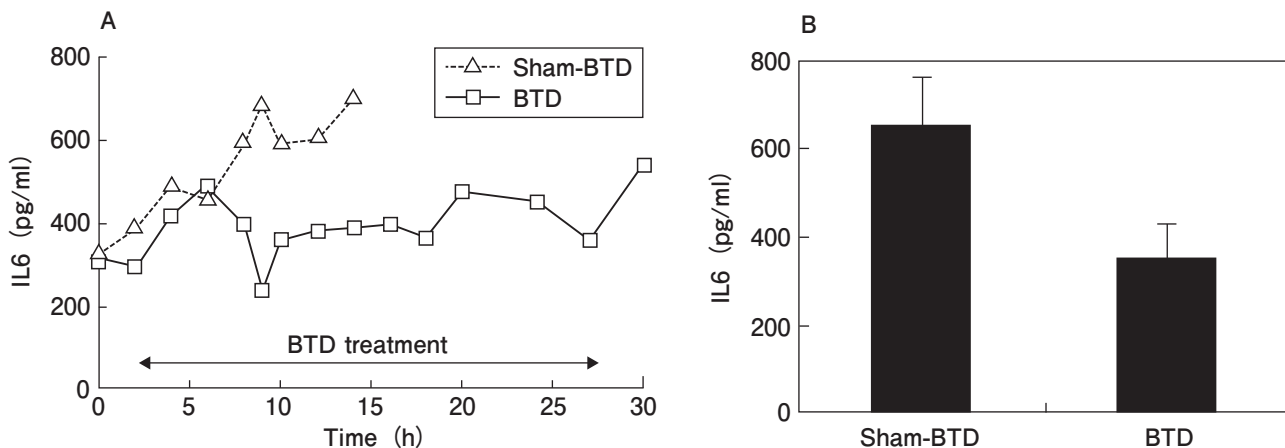


図4 LPS 静注開始後 Sham-BTD 群, BTD 群の典型例の血清 IL-6 濃度推移 (A) と 6 時間後の IL-6 濃度平均値 (B)  
 A: 循環治療前・中・後の Sham-BTD 群と BTD 群の IL-6 濃度推移の典型例を, B: LPS 静注開始 6 時間後の 2 群の平均血清 IL-6 値を示した. BTD 群で有意な低値を示し, Sham-BTD 群の約 2 分の 1 の値であった. (文献 20 より)

イン値は LPS 静注後無治療群, Sham-BTD 群に比し BTD 群で低く維持された. 濾過効果は両者で同一であることから, その差は, サイトカイン除去量差ではなく, ヤギ体内のサイトカイン産生細胞のサイトカイン産生活性が BTD 治療で抑制されることに因ることが強く示唆された.

現在, 作製された BTD は 3 カ月間機能を維持できることが確認されており, その間の急性患者の発生を待機できる. また, 慢性透析患者の合併症予防のための計画使用には十分対応可能である. BTD システムを用いることによる毒性, 癌化などに対する安全性と安定性は確認され, 探索的臨床研究を実施後, 臨床治

験に移行する段階にきている. まず, 敗血症などから多臓器不全患者の救命率の向上のための治療法として用いられた後, 慢性維持 HD 患者の慢性炎症や心血管合併症などの予防, または進展防止法としての使用が期待される. 限りある RPTEC の大量増殖のために増殖用無血清培地を開発し<sup>21)</sup>, また, p16 に対する siRNA を培地に添加し<sup>22)</sup>, 必要な細胞数を獲得している.

### 3 尿細管機能の付加

— 選択的再吸収の付加 (細胞不使用の場合)

尿細管上皮細胞を用いない場合, 細胞以外での個々の代謝または内分泌機能付加技術は現状ではハードル

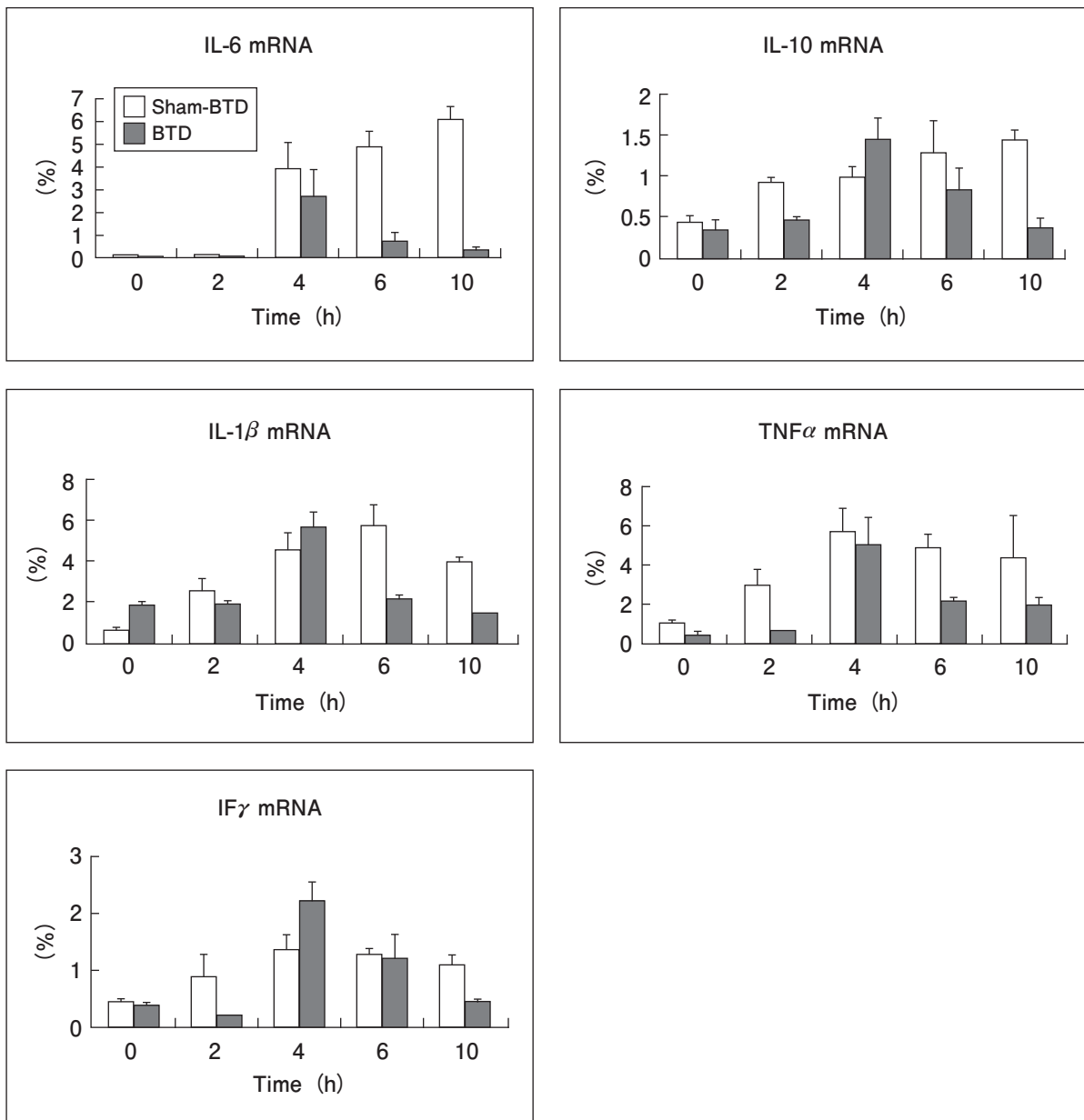


図5 RT-PCRによるBTD治療ヤギの末梢血単核球の炎症性・非炎症性サイトカインの発現レベル

バイオ人工尿管治療前・中・後のSham-BTD群, BTD群の末梢血単核球のRT-PCRによるIL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, インターフェロンγ (IFγ) のmRNA発現推移を示した。Sham-BTD群ではLPS静注後各mRNAの発現は亢進したが, BTD群ではLPS投与直後に亢進した各mRNA発現はその後経時的な低下を示した。(文献20より)

が高く、一般に、有用物質の再吸収機能のみを代替することが目指されている。濾過液を再生するために老廃物・水を除去し、電解質などを含めた有用物質を再吸収することなら、人工膜作製技術とナノテクノロジーの合体による実現が考えられている。すでに、それに応えるような取り組みは存在している。

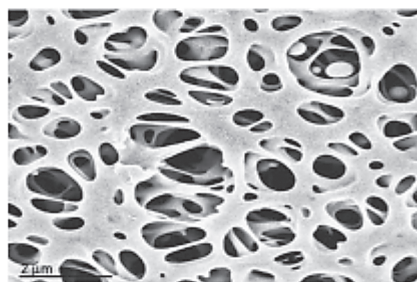
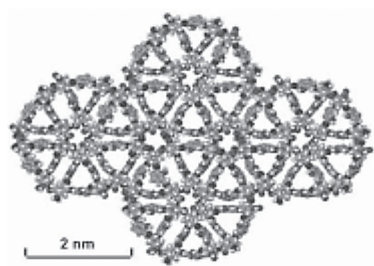
Nissensonらは、2種の異なる多孔性人工膜を用いる“ネフロン・フィルタ”とする概念を発表している<sup>2)</sup>。これは、先端工学技術を用いた人工ネフロンを開発す

るものであり、糸球体様濾過膜 (G膜) と、精密原子技術を用いて作製したナノ孔径をもった尿管様薄膜 (T膜) と小型周辺機器を用いるシステムである (図6)。

G膜は従来のポリマー濾過膜と同様の性能のものであるが、T膜は原子による事前に設定した膜孔径を有する新しいテクノロジーで作製している。G膜の孔径はマイクロメートル (μm: 1mの千分の1) であるが、T膜はナノメートル (nm: 1mの10億分の1) であ

T membrane

G membranes



- Selective transport
- Predetermined/controlled pore size
- Atomically engineered pore size/functionality
- Ultra-thin active filtration layer

- Unselective transport
- Wide distribution of pore sizes
- No opportunity for precise atomic placement
- Relatively thick, often low flux

図6 選択的透過できるように電子的にナノ孔径制御された膜 (T膜) と既存の血液濾過膜同様のマイクロ孔径のポリマー膜 (G膜) の構造・機能比較 (文献 23 より)

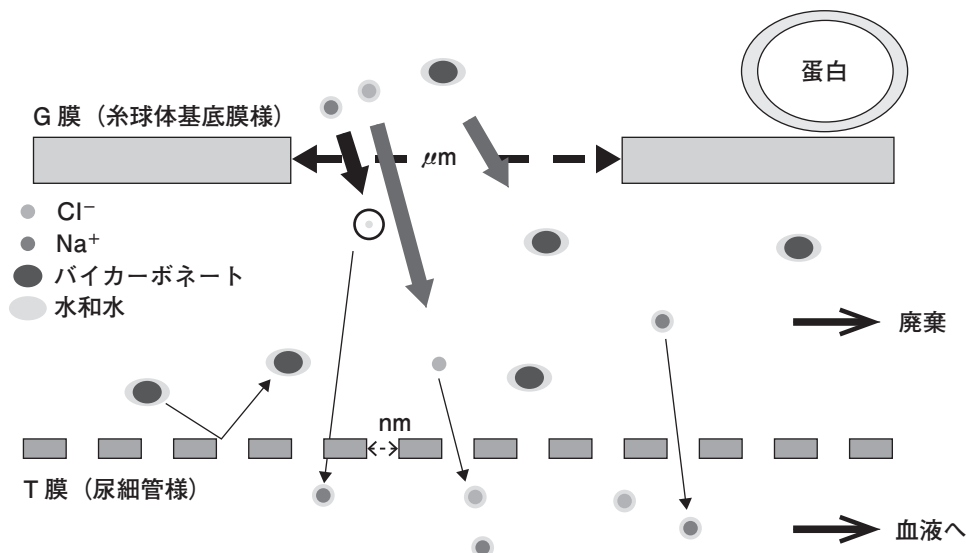


図7 G膜で得られた濾過液とT膜を通過した再生液の電解質組成の変化

既存のポリマー膜と同様の糸球体様膜 (G膜) で濾過された患者血液の濾過液は、孔径がその 1000 分の 1 レベルの尿管様膜 (T膜) を通過できる分子またはイオンは患者体内に戻り、そうでないものは廃棄される。その際、分子径よりも分子を取り巻く水和水も含めた径 (水和径) が通過に影響する。

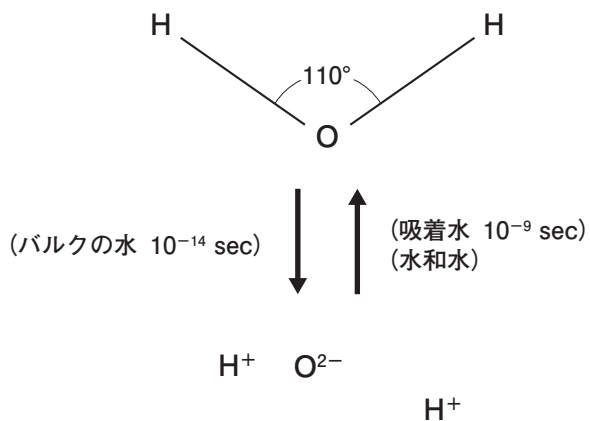


図8 水の構造上の変化と環境変化にともなう異なる変移速度  
水分子は H<sub>2</sub>O としてのみ存在するのではなく、H<sup>+</sup> 2つと O<sup>2-</sup> とに分かれたり、離れたりしている。全ての原子が同じ速度で変化するのではなく、溶質とは無関係に存在する自由水 (バルク水) では 10<sup>-14</sup> 秒の速さで変化し、溶質の周りを取り巻く水和水は 10<sup>-9</sup> 秒と遅く変化する。一般に、膜表面でも水の変化は遅くなり、蛋白は吸着されやすくなる。

り、きわめて孔径が小さく、分子の小さな水や電解質イオンは通すが、それ以上の分子は通せない (図7)。しかも、水には溶質を取り巻く水 (水和水という) と取り巻かない自由な水 (バルクの水という) があり、原素の動きが異なる (図8)。すなわち、バルクの水では、 $O^-$  と 2 個の  $H^+$  が結合したり離れたりする速度は  $10^{-14}$  秒であるに比し、水和水では  $10^{-9}$  秒と低速である。同じ孔径を通過できるかどうかは、分子径のみならず水和水も含めた孔径 (水和径) が膜孔径を下回ることが必要である。したがって、患者血液から G 膜を通して対側に出た濾過液にある物質の中で水分子、電解質イオンは T 膜を通して血液に戻すことができるが、ブドウ糖やバイカーボネートは通過できず、尿毒素とともに廃棄される可能性があり、別に補充バッグに入れたそれらの溶液を持続注入する必要がある。

今後、一層適正な G 膜孔径を設定することが必要であるが、膜を用いた濾過液再生と再利用は不可能ではない。実際、我が国の物質材料研究機構の一之瀬らの 1 nm 孔径の diamond-like carbon (DLC) 膜は、有機溶媒系の分子量の近いアゾベンゼン  $C_{12}H_{10}N$  (分子量 182.23) とトルエン  $C_7H_8$  (分子量 92.14) を分離可能であり<sup>24)</sup>、親水系では G 膜として利用できる可能性を有する技術である。

## おわりに

既存技術を少し改良するにも大変な労力と能力、時間を要するのが実情であろう。既存技術を飛び越えた次の技術を構築し、安全性と有効性、そして経済性をもクリアしなければ新しい治療法は実現しない。透析療法が実現して半世紀になろうとするが、新しい人工腎臓の実現にはもう少し時間が要求されている。まずは、間歇血液透析治療の限界を克服し、持続治療を実現させることであろう。次に、尿管の有用物質の再吸収機能、さらに、代謝、内分泌機能を実現させることになる。その取り組みの現状を述べたが、細かい詰めの研究にもう少しの時間を要するであろう。

## 文 献

- Gura V, Ronco C, et al. : A wearable hemofilter for continuous Ambulatory ultrafiltration. *Kidney Int* 2008; 73 : 497-502.
- Gura V, Macy AS, Beizai M, et al. : Technical breakthroughs in the wearable artificial kidney (WAK). *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4 : 1441-1448.
- 小久保謙一, 松田兼一, 他 : 長時間使用を目的とした細径中空糸からなる小型血液濾過器. *人工臓器* 2016; 45(2) : S12.
- Saito A, Suzuki H, Bomsztyk K, et al. : Regeneration of peritoneal effluent by Madin-Darby canine kidney cells-lined hollow fibers. *Mater Sci & Eng C* 1998; 6 : 221-226.
- Kanai N, Fujita Y, Kakuta T, et al. : Effect of extracellular matrix on renal epithelial cell attachment on the polymer substrate. *Artif Organs* 1999; 23 : 114-118.
- Terashima M, Fujita Y, Sugano K, et al. : Evaluation of water and electrolyte transport of tubular epithelial cells under osmotic and hydraulic pressure for development of bioartificial tubules. *Artif Organs* 2001; 25 : 209-212.
- Fujita Y, Kakuta T, Asano M, et al. : Evaluation of active transport and morphological changes for bioartificial renal tubule device using MDCK cells. *Tissue Eng* 2002; 8 : 13-24.
- Asano M, Fujita Y, Ueda Y, et al. : Renal proximal tubular metabolism of protein-linked pentosidine, an advanced glycation end product. *Nephron* 2002; 91 : 688-694.
- Saito A : Development of bioartificial kidneys. *Nephrology* 2003; 8 : S10-S15.
- Saito A : Research in the development of a wearable bioartificial kidney with a continuous hemofilter and a bioartificial tubule device using tubular epithelial cells. *Artif Organs* 2004; 28 : 58-63.
- Fujita Y, Terashima M, Kakuta T, et al. : Transcellular water transport and stability of expression in aquaporin1-transfected LLC-PK1 cells in the development of a portable bioartificial renal tubule device. *Tissue Eng* 2004; 10 : 711-722.
- Ozgen N, Tarashima M, Aung T, et al. : Evaluation of long-term transport ability of a bioartificial renal tubule device using LLC-PK1. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 : 2198-2207.
- Sato Y, Terashima M, Kagiwada N, et al. : Evaluation of Proliferation and Functional Differentiation of LLC-PK1 Cells on Porous Polymer Membranes for the Development of a Bioartificial Renal Tubule Device. *Tissue Eng* 2005; 11 : 1506-1515.
- Ueda H, Watanabe J, Konno T, et al. : Asymmetrically functional surface properties on biocompatible phospholipid polymer membrane for bioartificial kidney. Published online 12 December 2005 in Wiley InterScience.
- Saito A, Tun A, Sekiguchi K, et al. : Present status and perspective of the development of a bioartificial kidney for chronic renal failure patients. *Ther Apher Dial* 2006; 10 : 342-347.
- Saito A, Tun A, Sekiguchi K, et al. : Present status and perspectives of bioartificial kidneys. *J Artif Organs* 2006; 9 : 130-135.
- Inagaki M, Yokoyama Tun A, Sawada K, et al. : Prevention of LLC-PK1 cell overgrowth in a bioartificial renal tubule device using a MEK inhibitor, U0126. *J Biotechnol* 2007; 132 :

- 57-64.
- 18) Saito A, Sawada K, Fujimura S : Present status and future perspectives on the development of bioartificial kidneys for treatment of acute and chronic renal failure patients. *Hemodial Int* 2011; 15 : 183-192.
- 19) Sanechika N, Sawada K, Usui Y, et al. : Development of bioartificial renal tubule devices with lifespan-extended human renal proximal tubular epithelial cells (RPTEC). *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 : 2761-2769.
- 20) Saito A, Sawada K, Fujimura S, et al. : Evaluation of bioartificial renal tubule device prepared with lifespan-extended human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27 : 3091-3099.
- 21) Takahashi H, Sawada K, Kakuta T, et al. : Evaluation of Bioartificial Renal Tubule Device Prepared with Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells Cultured in Serum-Free Medium. *J Artificial Organs* 2013; 16 : 368-375.
- 22) Saito A : Kidney tissue engineering. Boccaccino AR and Ma PX(eds.). *Tissue engineering using ceramics and polymers*, Second Edition. Amsterdam : Woodhead Publishing Ltd, 2014; 414-438.
- 23) Nissenson AR, Ronco C, Pergamit G, et al. : The human nephron filter : toward a continuously functioning, implantable artificial nephron system. *Blood Purif* 2005; 23 : 269-274.
- 24) Karan S, Samitsu S, Peng X, et al. : Ultrafast Viscous Permeation of Organic Solvents through Diamond-Like Carbon Nanosheets. *Science* 2012; 335(4) : 444-447 DOI : 10. 1126/science. 1212101