



Title	新規人工腎臓を志向するリポソーム固定化膜デバイスの開発と機能評価に関する研究
Author(s)	菅谷, 博之
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23497
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

新規人工腎臓を志向するリポソーム固定化膜デバイスの
開発と機能評価に関する研究

Study on Development of Immobilized Liposome
Membrane Device for Novel Artificial Kidney and
Evaluation of Its Function

2009年3月

菅谷 博之

新規人工腎臓を志向するリポソーム固定化膜デバイスの
開発と機能評価に関する研究

Study on Development of Immobilized Liposome
Membrane Device for Novel Artificial Kidney and
Evaluation of Its Function

博士（工学）論文提出先
大阪大学基礎工学研究科

2009年3月

菅谷 博之

序 文

この研究は、大阪大学基礎工学研究科物質創成専攻化学工学領域の久保井亮一教授のもとで2008～2009年に実施された。

本論文では、腎不全患者の治療として用いられている人工腎臓の新規な機能を志向するデバイスとして、リポソームを固定化する中空糸膜デバイスの創成と機能評価について取り組み、リポソーム固定化人工腎臓 (ILM-AK) を創成することに成功した。ILM-AK は従来の人工腎臓が β_2 -microglobulin などの過剰成分を単に除く機能であったことに比べて、リポソーム本来が有する多様なタンパク質との相互作用および最近大きな問題となってきたストレスを低減する機能を付加できる画期的な治療デバイスである。本研究では、中空糸膜の分離機能を維持したうえで新たな機能を発現できることをミニモジュールスケールでの *in vitro* 評価にて確認することができた。次世代の新規な人工腎臓として有望である。

大阪大学基礎工学研究科
物質創成専攻化学工学領域

菅谷博之

菅谷博之

目 次

序論	1
第 1 章 持続人工腎臓の創製と既存人工腎臓の課題	13
1-1 緒言	13
1-2 実験	17
1-2-1 抗血栓性人工腎臓システム	17
1-2-2 タンパク質分離デバイス	18
1-3 結果および考察	20
1-3-1 抗血栓性持続除水システム(ACUS)の設計	20
1-3-2 PAN-PEO膜の構造と抗血栓性	22
1-3-3 動物実験を用いた抗血栓性効果確認と要因分析	25
1-3-4 臨床での持続使用検討	26
1-3-5 タンパク質分離用中空糸膜の分離特性	27
1-3-6 多段分離システムによるタンパク質分画設計	27
1-3-7 血清からの高効率タンパク質分離	29
1-3-8 透析患者血液のプロテオーム解析	31
1-4 まとめ	35
第 2 章 親水性ポリマーの構造解析とリポソーム固定化デバイス設計 に向けた基礎検討	38
2-1 緒言	38
2-2 実験	41
2-2-1 親水性材料の物性評価と吸着挙動解析	41
2-2-2 リポソーム充填中空糸膜の作製	44
2-2-3 正濾過係数、逆濾過係数の測定と理論計算	45
2-3 結果および考察	47
2-3-1 PVP とポリスルホン膜の相互作用	47
2-3-2 PVP の生体成分付着抑制効果 (血小板付着抑制)	50

2-3-3	PVP の水中での構造解析	51
2-3-4	PVP 表面でのタンパク質付着抑制効果	55
2-3-5	リポソーム充填中空糸膜の基本物性	58
2-3-6	リポソーム充填膜モジュールを用いた酸化・断片化 SOD の回収	65
2-3-7	正濾過係数・逆濾過係数の算出	70
2-3-8	各種形状・膜パラメーターと性能向上	72
2-3-9	内部濾過促進型ダイアライザーの設計と性能確認	73
2-4	まとめ	76
第3章 リポソーム固定化人工腎臓(ILM-AK)の創製		78
3-1	緒言	78
3-2	実験	80
3-2-1	リポソーム固定化マトリックスゲルの創製	80
3-2-2	固定されたリポソーム膜モジュールの準備	82
3-2-3	アミノ酸の分配測定およびタンパク質の吸着特性	84
3-3	結果および考察	85
3-3-1	ヒドロゲルを形成する Polyions 活性化複合体	85
3-3-2	XG/PEI ゲル製剤のための操作条件の影響	87
3-3-3	ILM-AK の作製と膜特性	89
3-3-4	ILM-AK のアミノ酸分配特性	93
3-3-5	ILM-AK のタンパク質吸着特性	95
3-4	まとめ	96
第4章 ILM-AK の次世代型新規人工腎臓としての評価		97
4-1	緒言	97
4-2	実験	98
4-2-1	リフォールディング実験	98
4-2-2	CAPD 液を用いた循環実験	99
4-3	結果および考察	100

4-3-1	CABのリフォールディング	100
4-3-2	CAPD液からのタンパク質除去、SOD活性	103
4-3-3	メンブレンチップを用いた処理液の特性解析	106
4-4	まとめ	110
	総括	111
	将来研究への提言	115
	使用記号	118
	引用文献	119
	オリジナル論文リスト	126
	国際学会発表	127
	謝辞	128

序 論

リポソームは、外部環境やストレスを認識してタンパク質/ペプチドなどの生体物質と相互作用し、分子シャペロン様機能(タンパク質リフォールディングの介助機能)、酵素様機能(LIPOzyme 機能)など、各種の潜在機能を誘導する事が明らかにされつつある。ここでは、血液透析操作により、通常より高レベルのストレスに暴露されていると考えられる透析患者のストレス負荷を低減させることを目的として、リポソーム固定化人工腎臓(ILM-AK)の創製と機能評価を試みた。

第1章 持続人工腎臓の創製と既存人工腎臓の課題

血液が人工物との接触により誘起されるストレス応答反応(凝固反応)を抑制するために、素材、血液流れを工夫した中空糸膜モジュールシステムを創製した。このシステムは実際の臨床使用において、最長で1週間抗凝固剤無しでの使用という世界最長期間の体外循環を記録したが、ストレスを一部でも負荷すると体内機能の極端な低下が誘導される。特に、モジュール膜部分の負荷が大きい事も明らかにした。また、患者のストレス状態を解析するために、特定のタンパク質を数百倍に濃縮する膜分離デバイスを創成し、従来にない微量の分析を行うことを可能とした。本デバイスを使用したプロテオーム解析を行ったところ、透析患者の非常に多くのタンパク質が切断・変性されており、血液が高いストレス負荷状態にある事を明らかにした。これらの結果から、次世代型デバイスには、1) 生体適合性の高い、優れた親水性膜表面の創製、2) ストレス損傷を受けた生体内環境の修復機能を有する生体膜機能の創製が必要であることがわかった。さらに、Build-Up 型人工膜材料設計手法に併せて、モデル生体膜(リポソーム)の機能利用をコアとする Build-Up、Break-Down 統合型の設計手法の必要性が示され、新規人工腎臓開発の課題が明らかにされた。

第2章 親水性ポリマーの構造解析とリポソーム固定化デバイス設計に向けた基礎検討

まず、親水性高分子の表面構造と非付着特性との関係について検討した。膜モジュール基材であるポリスルホン膜(PSf)をポリビニルピロリドン(PVP)を用いて親水化処理し、高分子膜表面の水分子の特性解析、ならびに、タンパク質などの生体成分との相互作用を解析した。親水化処理した基材表面では、含水率が高く、これに対応して、各種タンパク質の吸着が抑制され、血小板の吸着は特定の親水性高分子分率(PVP/PSf=1/4)以上にて急激に低下することを明らかにした。また、リポソームを膜に充填したモジュールを作成して(リポソームは未固定)、膜デバイスの基礎的な特性を評価したところ、人工腎臓としては十分な機能を維持できることを確認できた。また、潜在活性ペプチドを吸着分離して抗酸化ストレス機能を付与し、体内の酸化ストレスを抑制するモデル実験について検討し、SOD LIPOzyme 充填型モジュールでは、SOD 様活性の誘導が可能である事を示した。ただし、未固定ゆえにリポソームの溶出・凝集が確認された。また、人工腎臓内の圧力・流れの解析モデルから、モジュール内での濾過による負荷が大きく、その内部においてストレス局在領域が存在する可能性が示唆された。

第3章 リポソーム固定化人工腎臓(ILM-AK)の創製

リポソームを安定した状態(非溶出、非凝集)にて使用するために、リポソームが分離膜の中に内包されたリポソーム固定化人工腎臓(ILM-AK)の創製を試みた。固定化のために、リポソームをマトリックスゲルで内包させることを考案し、天然型の親水性高分子を活用する事も視野に入れて検討した。各種マトリックスゲルの特性を解析した結果、天然型のキサンタンガム(XG)を用いることにより、非常に高い含水状態のゲルを作製する事が可能である事がわかり、ポリエチレンイミンと架橋剤を用いて架橋させたゲルであれば98%程度の高含水率を達成できることがわかった。また、このゲルでリポソームを分離膜表層の空隙に内包することも確認した。さらに、人工腎臓用中空糸膜モジュール内部に固定化することにも成功し、この ILM-AK に内包固定化されたリポソームは最小限2週間程度は安定に存在することを確認した。得られた ILM-AK の機能を最大限に活用するためのデバイス設計を行い、このモデル系を用いて、アミノ酸およびタンパク質の分配特性を検討した。ILM-AK においては、疎水性のアミノ酸の吸着が強く、また、インシュリンなどの水素結合不安定な(ρ 値の低い)タンパク質との相互作用が強いなどの特徴があることが確認できた。

第4章 ILM-AK の次世代型新規人工腎臓としての評価

ILM-AK の人工腎臓機能としての評価を行った。この際、生体内に存在するストレス負荷タンパク質の構造正常化、ならびに、生体内環境修復を目的として、タンパク質(炭酸脱水酵素:CABを使用)のリフォールディング実験を行い、ILM-AK では構造が異常化したタンパク質を取り込む機能があること、および、高いリフォールディング特性(構造正常化機能)を示すことを確認した。また、モデル液として患者(腹膜透析治療患者)の置換液(CAPD液)を用いて、ILM-AK および中空糸膜のみのコントロール(AK)を通過させたときの成分変化および Membrane Chip によって測定することができるストレス状態の変化を解析したところ、ILM-AK を用いた場合、構造異常性の高いタンパク質を吸着するものの、CAPD 溶液中の β_2 -microglobulin、や SOD などの正常な構造状態にあるタンパク質の構造変化・吸着は抑制することがわかった。以上の様に、ILM-AK を用いて体液のストレス状態を抑制できる可能性が示唆された。

まとめ

本論文では、腎不全患者の治療に用いられている人工腎臓に代わる次世代型の新規な人工腎臓を志向するデバイスとして、リポソームを固定化した中空糸膜デバイスおよび基材の創成と機能評価に取組み、ILM-AK の創成に成功し、これが、ストレス負荷の低減機能を有することを確認した。

序論

腎臓の機能を失った慢性腎不全患者の腎臓の代わりに尿毒症の病因物質を血液中から分離・除去するために、血液透析療法という治療が行われており、ここでは透析器(Dialyzer)と呼ばれる人工腎臓(Artificial Kidney)が使われている(Fig.1). 人工腎臓に要求されている特性は、一般的には①有害物質の選択的除去、②塩・水分の調節、③生体適合性であり、このほかにも、最近では軽量であることなどの取り扱いの容易さなどが望まれている。人工腎臓には、微細な孔を有する膜が用いられており、有害物質の選択的除去、塩・水分の調節を濾過、透析および吸着により行うことができる。その中でも中空糸膜を利用した人工腎臓は、1万本近い中空糸状の高分子多孔質膜で構成されており、平膜タイプに比べて充填血液量を少なくすることができるためにコンパクトで取り扱い性が優れており、広く普及している。

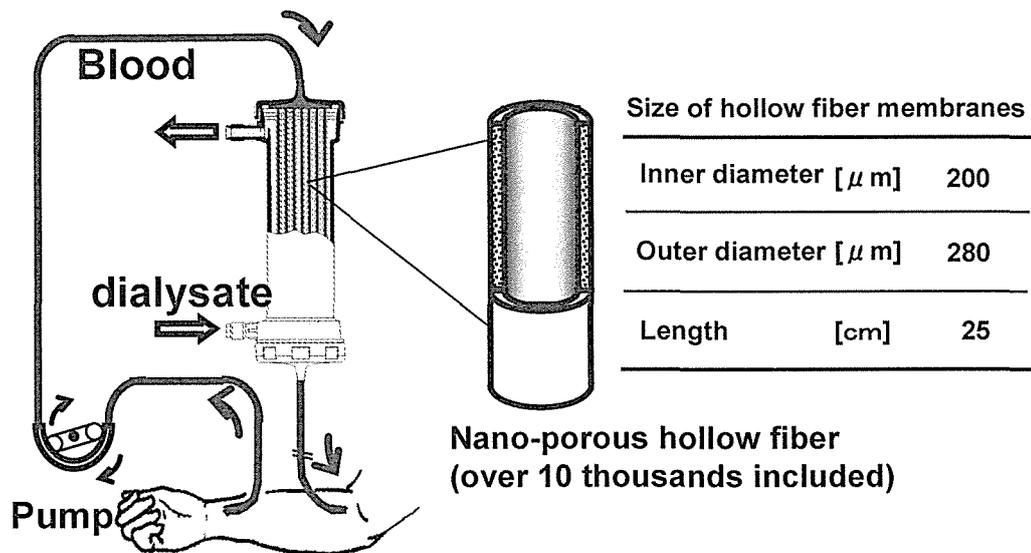


Fig.1 Hemodialysis and Artificial kidney(Dialyzer)

この血液透析は、1912年アメリカの Abel により初めて動物実験が行なわれ、1945年にはオランダの Kolff により回転ドラム型人工腎臓が発明され、救命に成功した。本格的に治療法として普及したのは1960年代からであり、1960年にはノルウェーの Kiil によりキール型人工腎臓が、そして中空糸型人工腎臓は、1967年に Stewart により発明された。このように、人工腎臓の開発が進むと共に患者の病態も明らかになり、病態を改善研究と人工腎臓の

開発が進んできた。近年では、長期透析患者の合併症の一つである手根管症候群において患部に沈着する主体の成分が β_2 -microglobulin (分子量 11800) であることが報告されて以来 (下条他, 1985), 分子量 1 万以上のタンパク質の除去に注目が集まった。血液透析療法では、血液中の血球や Albumin (分子量 69000) など有用なタンパク質が血液中から過度に漏洩することを防ぐ必要がある。そのため、分子量が 2~3 万の Albumin に分子量に近い有害物質の除去を行うためには、よりシャープな分画特性の膜が要求され、膜の分離特性の向上もしくは、血液ろ過透析などの使用方法に関する研究が集中した。一方、近年、合併症の原因物質が、Albumin 近傍やより大きな分子量領域にも存在することが報告されるようになり、このような透過による物質除去だけでよいのかという問題提起が透析医学会や研究会でも言われている。造血作用を阻害する物質や透析掻痒症を誘起する一部の新しい物質においては、これを選択的に吸着、除去できるような特性の膜の開発が期待されている。しかしながら、その医療的な根拠にはまだ不明な点も多いことや、Albumin よりも大きな分子量の物質を濾過のような篩い分けの原理にて除去することは困難である。これを改善するために、ポリメタクリル酸メチル膜の吸着特性を用いた除去の研究が進められている (Kobayashi et al., 1986, Sugaya, 1999 ; 山田他, 2004 ; 菅谷他, 2005 ; 菅谷他, 2007)。しかし、このアプローチも必ずしも十分というわけではなく、それらの病因物質を完全には取り除くことはできない。さらに、本質的な問題として、これらのアプローチは β_2 -microglobulin もしくは、その他の成分を除去するという考えであって、除去した物質自体の有する機能が発揮させずに体内から除去してしまう危険、あるいは、その他の、本来必要な成分をも取り除いてしまうというリスクも併せ持つ。本来は、異常な状態にならないように、事前に調節機能が働くデバイスであることが望ましいが、現在は間欠的に短時間にて蓄積されたものを除去する方法にとどまっている。さらには、血液透析治療をはじめとした体外循環治療の課題として、体外循環を行うこと自体のヒトに与えるストレスの問題がある。古くは、人工物と血液が接触することによって起こる血液凝固反応を抑えることができず、体外循環を行うことすら長らくできなかつたが、血液の凝固反応を抑制させるヘパリンなどの抗凝固薬が 1918 年に howell により研究され、臨床にて体外循環を行うことを成し遂げた。しかし、抗凝固薬の投与は、体内での出血のリスクや長期使用時における副作用のリスクがあるために、完全なも

のではなく、抗凝固薬を使用しないで治療できる低ストレスの人工腎臓の開発が期待されている。さらには、血液透析中に、血液が酸化ストレスを受け、動脈硬化を引き起こすことが言われており、血液中で酸化損傷を受けた酸化 LDL が高濃度に存在することが分かっている (Itabe et al.,1996)。これを改善するために、抗酸化作用を有しているビタミン E を透析膜表面に固定化した人工腎臓も市販されている (Girndt M et al.,2000; Miyazaki H et al.,2000;Shimazu T et al.,2001)。しかしながら、血管の年齢が健常人に対して約 20 年も亢進しているという状況を改善するまでには、まったく至っていない。また新たに、糖尿病を原疾患とする透析患者が導入患者の半数以上を占める状況になってきており、透析患者において、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) という、DNA の構成成分であるデオキシグアノシン (dG) が活性酸素などのフリーラジカルにより酸化されて生成した物質が高濃度に存在することがわかっており、高レベルのストレスに暴露されていると考えられる (Yokozawa et al.,1992)。ちなみに、この 8-OHdG は、活性酸素の関与が示唆されている癌、心臓病、脳卒中などの生活習慣病患者においても高濃度に存在しており、DNA に損傷を与えるほどの強いストレスを受けている状況であることがわかる。また、腎不全患者の病態との関係も指摘されている。アルツハイマー病も体内でのラジカルとの関係が強く示唆されている病態である。アルツハイマー病では、病理所見で、大脳皮質内に、老人斑、神経原線維変化、神経細胞死が見られるが、A β (アミロイド β 蛋白) が脳内で重合 (凝集) し易くなり、脳内に蓄積し、アルツハイマー病 (痴呆症、認知症) を発症すると考えられている。脳アミロイド β 蛋白 (A β) を形成 (惹起) させる酸化ストレスには、過酸化水素などの活性酸素が関与しているとも言われており、いかに現代において問題となっている疾患がストレスの影響を受けているのかがわかる。

このように、透析患者は血液透析操作により、通常より高レベルのストレスに暴露されていると考えられ、過大なストレスを与えてしまうことから、現在の人工腎臓の生体適合性は十分ではない。これらを本質的に解決する方法においては、再度、生体の機能に立ち返った人工腎臓の研究が必要であると考えた。

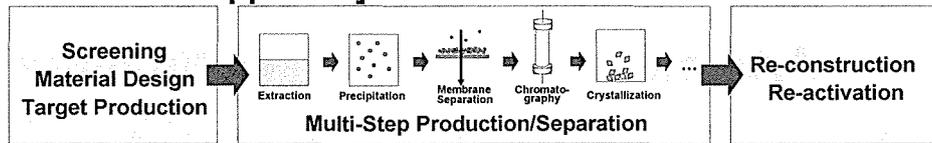
そこで、注目したのは、生体の細胞膜機能である。細胞は生命体を構成する最小単位であり、その内部は各種の機能性界面 (細胞膜) から構成される。細胞は、多重の膜構造から成り、

複雑・多様な異相系界面（生体膜）を介した物質移動・反応過程を高度に制御した、しなやかなマルチスケールの化学プロセスとも捉えられる。タンパク質などの高度に進化を遂げた要素物質とは異なり、生体膜は、外部環境の変動、異相界面同士の相互作用を経て、界面の特徴を組換えて新たな秩序構造を形成する点が特徴的である。生命現象の根本を担うのが、その界面にある「生体膜(Biomembrane)」のストレス応答であると考えられる事も可能である。細胞はSQDCE(Safety, Quality, Delivery, Cost, Environment)を満たす最小の化学プロセスであり、ユニット生体膜に基盤をおく科学技術の創出により、新たな人工腎臓の創成に貢献できると考えられる。

さらに、その機能の鍵は生体膜に隠されていると考えられる。従来型の、細胞内部の要素物質(遺伝子/タンパク質)の構造・機能に着目した Genome / Proteome に加え、生体膜そのものが誘導する潜在機能に主眼を置いた Membranome の重要性が認識されつつある。リン脂質二分子膜から成る閉鎖小胞リポソームは、環境変動にตอบสนองして集合状態を組換えて特性を変化させる分子集合体である。リポソームは、ナノオーダーの厚みの界面(約 5nm)に、水和水の相を含む中～低誘電率の薄膜相を保持している点で特徴的であり、界面における静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合安定性の制御により、高度な分子認識が可能である事が報告されている (Yoshimoto et al.,2007 ; H.T.Bui et al.,2008) 。さらには、環境変動(ストレス)条件下においてダイナミックに膜特性を変化し、リポソームが必要最小限の要素物質を認識・集積化し、酵素様機能を誘導する現象(LIPOzyme 機能 : Liposome + Enzyme)が報告されつつある (Yoshimoto et al.,2007 ; H.T.Bui et al.,2008;Umakoshi et al.,2008;L.Q.Tuan,2008) 。各種の報告の中で、リポソーム自身が有する「(動的)分子認識能」が必須不可欠な現象となっている。この様な、リポソームが有する分離機能をコア技術として、SQDCE を満たす人工腎臓を創成することが、本論文の基本コンセプトである。

このリポソームは、膜を介してスケラブル(30nm～数十 μ m)な内水相を保持するため、各種物質を封入した薬剤ベクターとして利用されるのが一般的であった。しかし、一連の研究により、ストレスを負荷した場合、各種の機能が誘導されている事がわかってきた(Kuboi et al.,2008)。(a)タンパク質の構造形成を促進する機能(Kuboi et al.,1997;Yoshimoto et al.,1999; Kuboi et al.,1997;Umakoshi et al.,2007), (b) ストレス条件でのタンパク質の膜透

[Conventional Approach]



[Liposome(Membrane)-Based Approach]

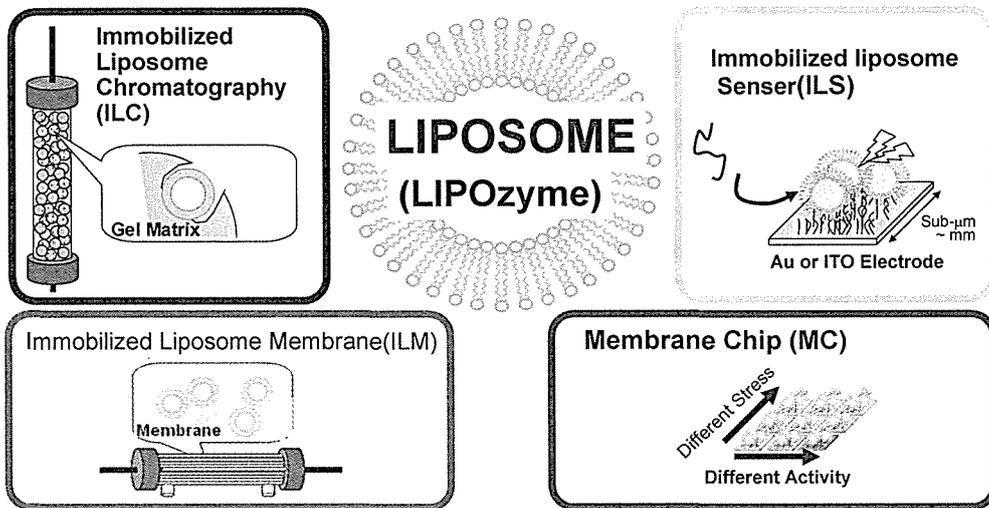
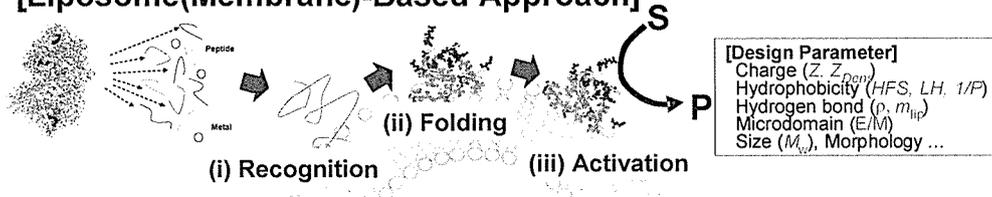


Fig.2 Conventional and liposome-based separation/analytical method.

過機能(Umakoshi et al.,1998), (c)環境を認識して凝集・融合する機能(Yoshimoto et al.,1999;Manayame et al.,2002), などである。ストレス負荷によって初めて顕在化される潜在機能群について体系的に解析し, リポソーム膜表層とタンパク質の静電的相互作用・疎水性相互作用, そして, 膜の疎水環境における水素結合力が適切に制御された場合に, 上記の機能が誘導されている事が示されている。また, 既に, リポソームを分離基材とした各種の解析ツールが報告されている(**Fig.2**)。例えば, (i)固定化リポソームクロマトグラフィー(ILC)(Yoshimoto et al.,1998; Yoshimoto et al.,2006; Yoshimoto et al.,2007), (ii)固定化リポソーム分離膜(ILM), (iii)固定化リポソームセンサ(ILS)(Morita et al.2006;Morita et al.2007;H.S.Jung,2007), (iv)リポソーム誘電分散解析法(LDDA)(Morita et al.,2003;Noda et

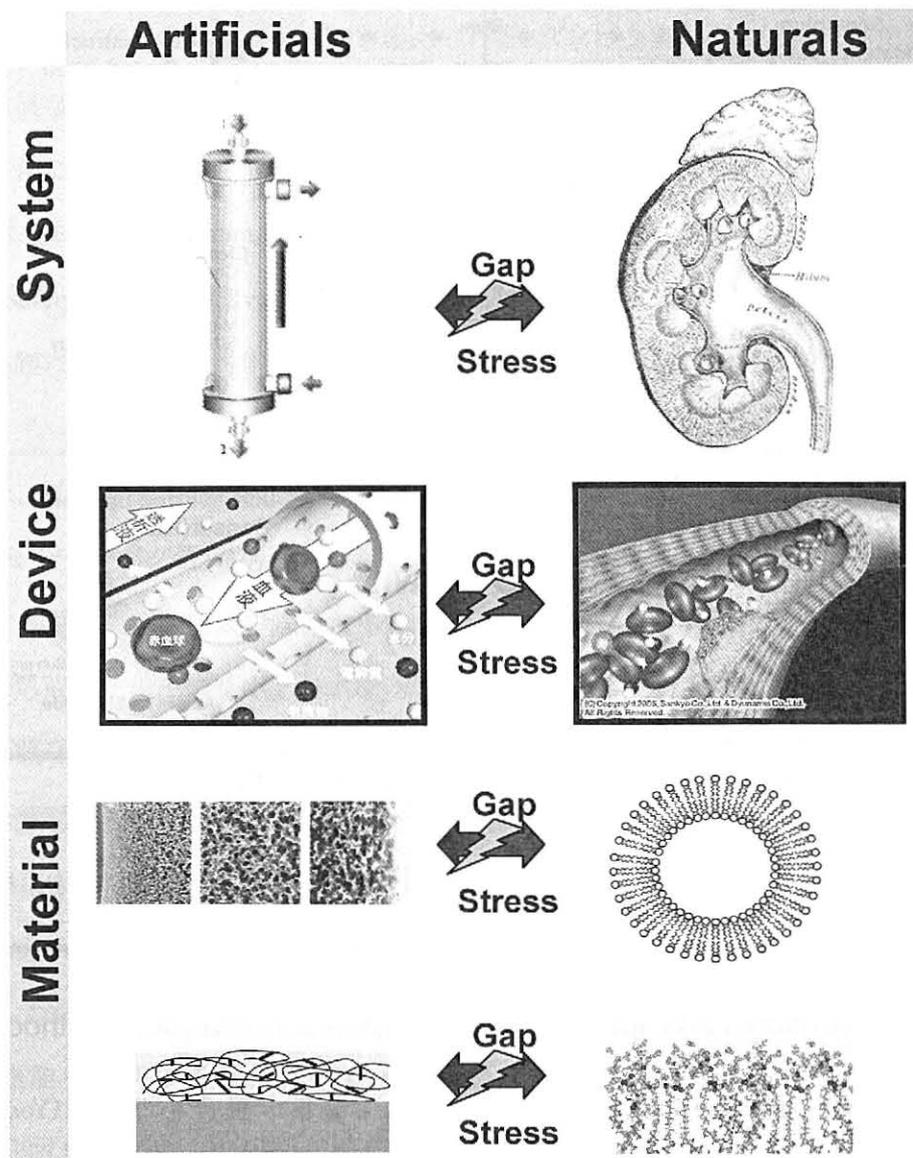


Fig.3 Hierarchical structure of artificial organ

al.,2006)を用いる事により、リポソームの識別機能を、静電的相互作用、疎水性相互作用、そして、リポソーム膜の水素結合安定性について独立した物性パラメータの解析が可能である。

本研究においては、このリポソームの多様な機能を活用して、革新的な人工腎臓を創成することを目的とする。Fig.3には人工腎臓の構成に対して階層的に整理した図を示した。細胞などの要素を組み上げて天然臓器を再生することは理想的な姿ではあるが、現在は左側の

人工的なアプローチのみによって人工腎臓が作られている。両者には大きなギャップとストレスが存在するが、そのギャップを埋めるべく、両者の特長を生かすことを試みた。具体的には、本研究では、既存の人工腎臓用中空糸膜にリポソームを固定化することを検討した。これまで、リポソームの固定化として、(a)物理的なトラップ法(Yang et al.,1994)、(b)抗原-抗体法(Yang et al.,1998)、(c)疎水性のリガンド法(Hara et al.,2000)、(d)共有結合法(Yang et al.,1999)、その他を通して検討されている。しかしながら、固定されたリポソームのキャパシティー、安定性の問題、カラム操作の困難性またはスケラビリティの問題などがあった。最近、リポソームが固定化された平膜も報告されているが、安定性は高くなく、実使用できるものではない。本論文では、膜自体の形態に着目して、リポソームを固定するより効果的方法を開発した

Fig.4 には従来の人工腎臓の機能と本研究で目指す人工腎臓の付加機能を対比させた。本研究では、先にも述べたとおり、人工腎臓の除去機能に正常化機能を付加することを目的とし、その達成手段として、リポソームを固定化した中空糸膜の創成と機能評価に取り組む。最終的な目的は、患者の透析ストレスを低減するとともに、病態の進行抑制を目指すものであり、腎不全の初期段階であれば改善も目指す。この目的の達成のためにこの図に示した各要素を明確にし、解決していく。本研究ではこのコンセプトの基本コンセプト部分までを確認することを目的とする。

基本コンセプトの確認が終了した後は、治療を意識した実際のモジュールを作製することになるが、このときは、いくつかの新しいモジュール形態が考えられる。**Fig.5** には、考えられる実施形態を示した。今回検討した形態は、③の現在の人工腎臓の膜内部にリポソームを固定化する方法であり、②の血液と直接接触する部分に固定化した場合に比べて、約 50 倍のリポソームの固定化が期待できる。ただし、血液と直接は接触しないので、拡散の速い低分子量物質に効果が限定される恐れがあるが、流す液体をバルス状に脈動を与えることにより、機能することも期待できる。また、透析液(dialysate)が事情により清浄化できておらず、endotoxin などの発熱物質の混入が懸念される施設や国では、本モジュールを用いることにより安全に透析治療を行えることが期待できる。

またこの他の形態として、①のプレモジュールや④のポストモジュールという考えもあり、

この場合は膜の細孔径部分を血球が通る程度に大きくしておくことにより、全血を膜に通過させて細胞膜とリポソームを直接接触させることも可能になる。このとき、プレモジュールとして使用した場合は、血液中に存在する会合状態の物質をフリーな状態に戻して下流の人

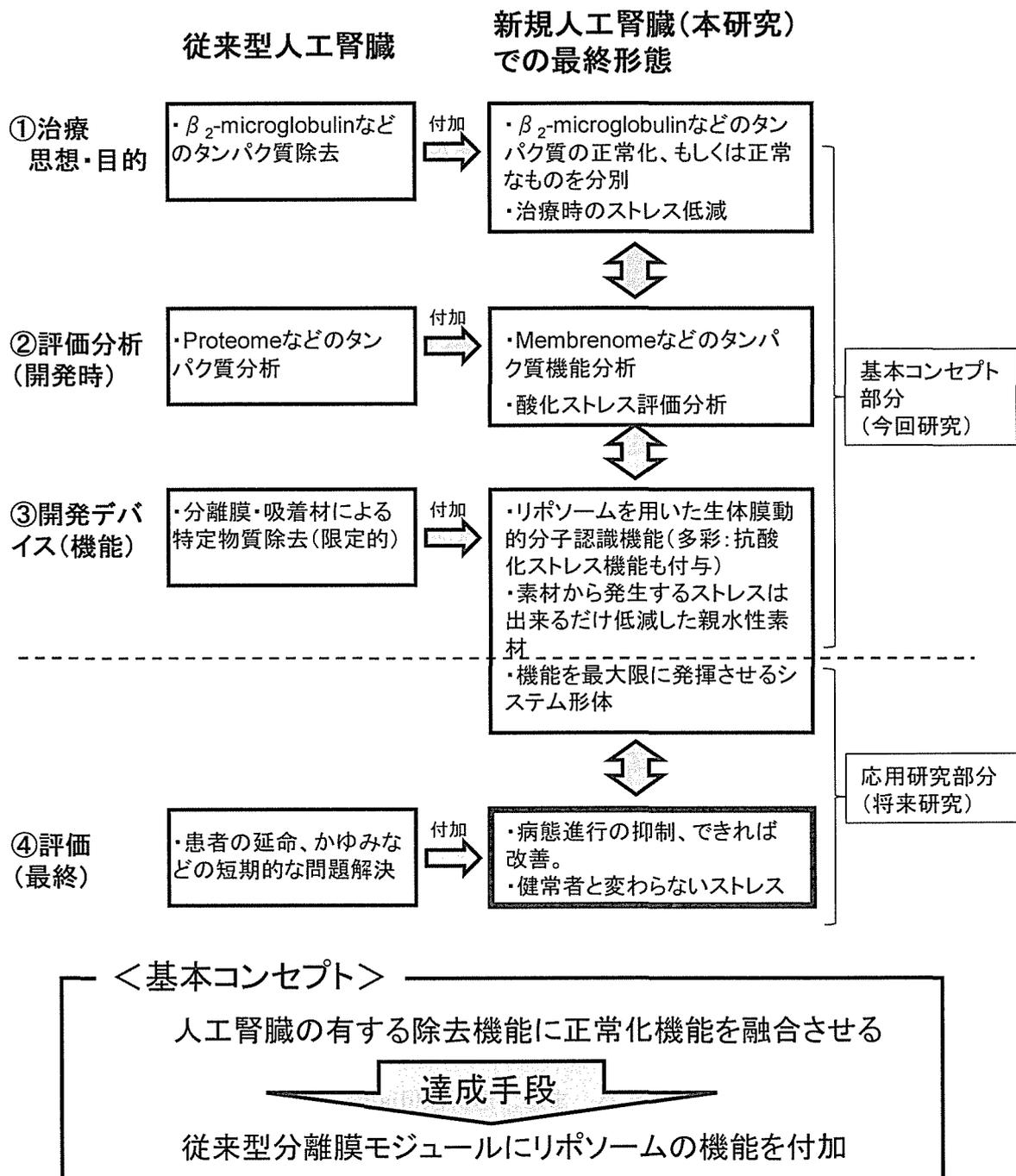


Fig.4 Final goal and research task of this study

工腎臓により除去する機能が期待できる。ポストモジュールとして使用した場合は、中空糸モジュールに発生した酸化ストレスの低減を行うことが期待できる。今回は、③の形態を用い、かつ、液の流れは中空糸の外側から内側に流すことを基本にした。これは、今回の研究の最大の目的であるリポソームの固定化と膜に付与した時のリポソームの機能発現を確認するという基本コンセプトの確認のために、より、リポソームを安定に充填固定化でき、信頼できるデータを取り得る形体として採用したものである。

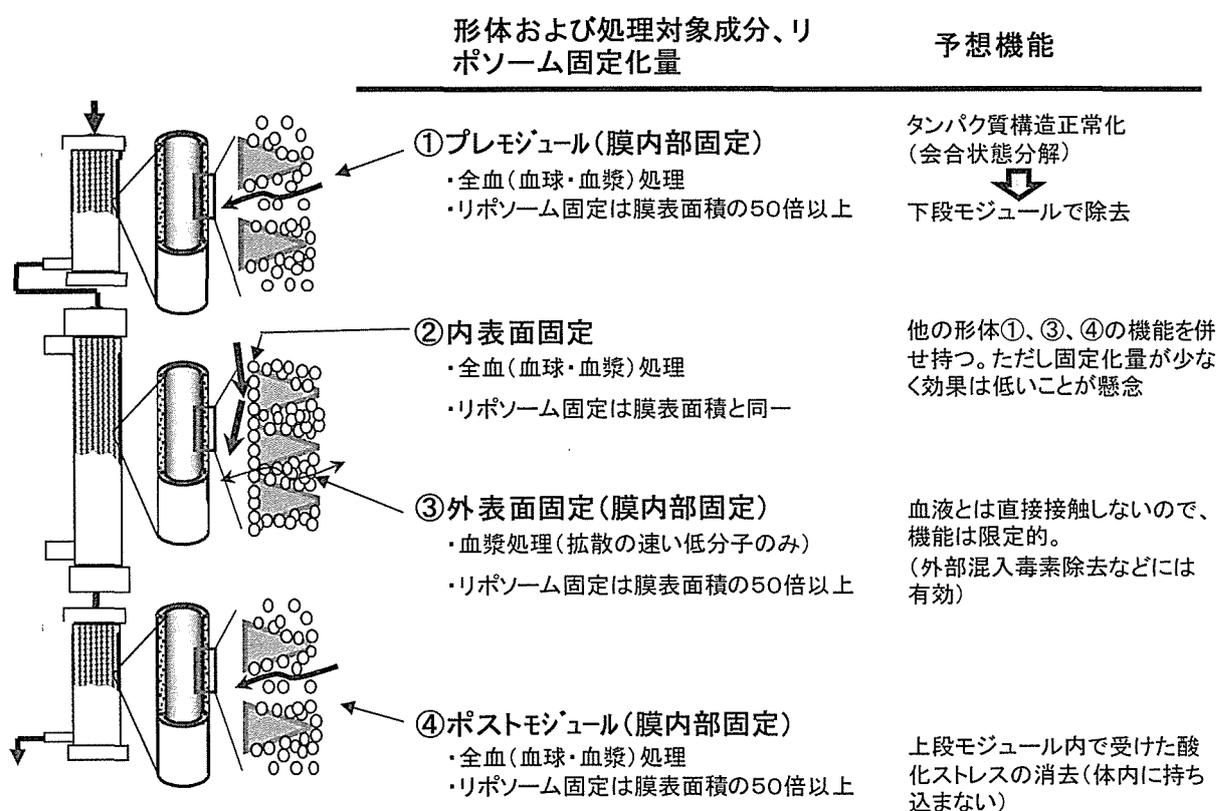


Fig.5 New design of Artificial Kidney

本論文では 1～4 章によって構成され、全体の構成は、Fig. 6 のフローによって示される。

第1章 持続人工腎臓の創製と既存人工腎臓の課題

血液は人工物と接触すると、凝固反応が進行する。この反応を抑制するために、抗凝固性の膜を創製し、さらに血液にストレスを与えないように流れを工夫した中空糸膜モジュール

システムを創製した。このとき、中空糸膜のみならずほかの部位においても素材や流れを変えたモデル試験を行い、デバイス回路内でストレスを一部でも付与するとどのような結果となるのかについても実験検証を行った。ただし、次世代型デバイスを構築するために、生体適合性の高い、優れた親水性膜表面の創製が鍵となる事は間違いなく、その際、既存の透析膜システムと生体システム(体内腎機能)との比較より、次世代膜の創成の方向性を議論した。

また、腎不全患者のストレス状態を解明するために、透析患者の血液を主とする体液の研究を行った。まず、タンパク質の高精度解析を行うために、タンパク質の分離性能を飛躍的に高めたデバイスを作製した。このデバイスを用いると特定のタンパク質を数百倍に濃縮することができ、従来にない微量の分析を行うことが可能となる。このデバイスを透析患者に適用し、質量分析機を用いてプロテオーム解析を行ったところ、非常に多くのタンパク質が切断・変性を受けて血液中に存在していることがわかった。すなわち、現在の人工腎臓はストレス負荷の大きい不完全なものであることが、明らかとなった。

第2章 親水性ポリマーの構造解析とリポソーム固定化デバイス設計に向けた基礎検討

ILM-AK の設計に必要な基礎データの研究について述べた。素材の研究においては、膜モジュール基材である疎水性の Polysulfone 膜(PSf 膜)を水溶性のポリマーであるポリビニルピロリドン(PVP)を用いて親水化処理した。このときの表面構造を解析し、親水性ポリマーが効果的に存在することにより、タンパク質から血小板などの細胞成分の吸着を抑制できることを確認した。これらの結果から、中空糸膜を用いることにより、ある程度、生体成分との無駄な相互作用、ストレスを抑制させた中空糸膜モジュールを作製することができると考えられ、リポソーム固定化中空糸膜に PSf/PVP 膜を用いることとした。

次に、リポソームと分離膜が共存する状況下で起こる現象を、リポソームを単に充填したモジュールを作製して、膜型のデバイスとしての特性を調べた。ここでは、リポソームが充填されている状態での基本的な膜特性を調べるとともに、機能を確認できる例として潜在活性ペプチドを吸着分離して抗酸化ストレス機能を付与し、体内の酸化ストレスを抑制するモデル実験について検討し、Lipozyme 充填型中空糸膜型人工腎臓(LLM)を用いて、SOD 様活性などを調べた。

これらのことから、リポソームを導入した中空糸膜モジュールでも、バッチ系で得られた知見と同様の現象を発現させることが可能であることが示唆された。また、最後には、リポソーム固定化中空糸膜モジュールを設計するにあたっては、モジュール内の流れを把握することが重要であり、これを予測するシミュレーションシステムの確立を試みた。

第3章 リポソーム固定化人工腎臓(ILM-AK)の創製

透析患者のストレス負荷状態を改善するために、モデル生体膜(リポソーム)が分離膜の中に内包されたリポソーム固定化膜モジュール(ILM-AK)の創製を試みた。固定化のために、リポソームをマトリックスゲルで内包させることを考案し、天然型の高分子を活用する事も視野に入れ、できるだけ、水の運動性を高めるために高含水率でのゲルの創製を試みた。また、このゲルでリポソームを膜表層の空隙に内包できることも確認した。さらに、人工腎臓用中空糸膜モジュール内部に固定化することも検討し、この ILM-AK に内包固定化されたリポソームの安定性を 2 週間まで調べた。得られた ILM-AK の機能を最大限に活用するためのデバイス設計を行うために、リポソームの機能がどのように発現されるのかについて基礎評価を行った。ここで、固定化されたリポソームの機能確認として、アミノ酸の分配特性、タンパク質の吸着特性を確認し、リポソームが有する本来の機能が維持されているのか否かを確認した。

第4章 ILM-AK の次世代型新規人工腎臓としての評価

ILM-AK の人工腎臓機能としての評価を行った。ここでは 2 種類のモデル実験を行った。一つ目は、タンパク質のリフォールディング実験であり、molten globule 状態 (3 次構造は変化しているが、コンパクトで比較的安定に存在する状態) のタンパク質を患者の変性タンパク質と仮定して、リポソーム固定化膜との相互作用を調べた。二つ目は、患者のモデル液として腹膜透析治療患者の置換液 (CAPD 液) を用いて、ILM-AK およびリポソームを固定していない単なる中空糸膜のみのコントロール (AK) を通過させたときの成分変化を調べた。さらに新しい試みとして、単にタンパク質の量を議論するにとどまらず、本人工腎臓の新規な特長を評価するために、当研究室にて開発されたメンブレンチップを用いた Membranome 解析

を試み、メンブレンチップによって測定することができるストレス状態の変化を調べ、ILM-AKではストレスの影響を抑制できているのかを確認した。

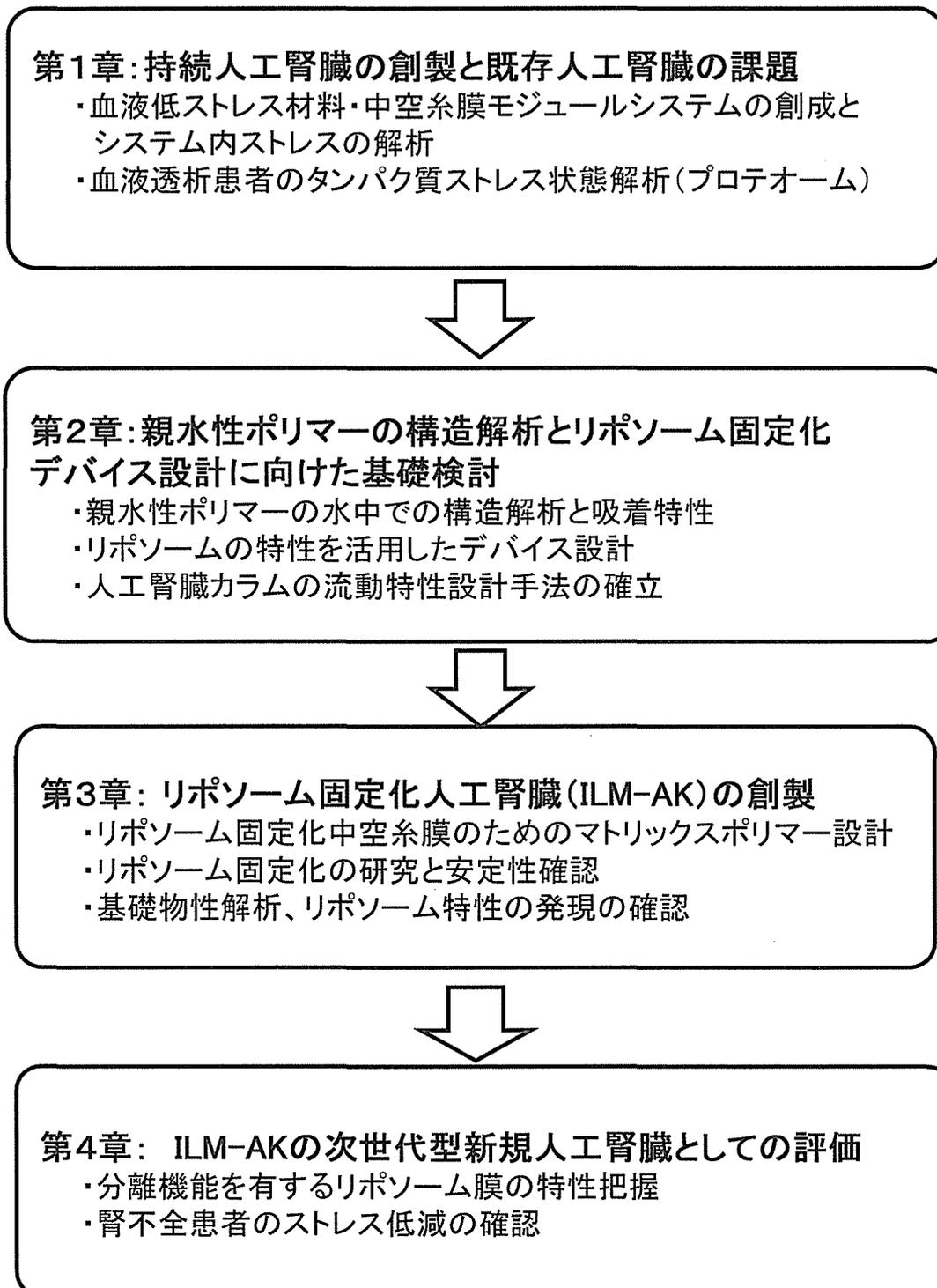


Fig6. Flow Chart of Present Thesis

第1章 持続人工腎臓の創製と既存人工腎臓の課題

1-1 緒言

腎臓の機能は尿の生成・排泄をはじめとして、ホルモン分泌など多岐にわたる。今だ、これら全ての機能を代替できるような人工腎臓は存在しない。現在、腎不全の治療法としては、血液浄化療法、腹膜透析、腎移植があるが、わが国では、一部の腎機能を代替する血液透析療法が主に行われている。血液透析療法は、慢性腎不全患者の体内に蓄積している尿毒症の原因物質である尿素、クレアチニンなどの低分子量の老廃物や過剰水分を取り除くために行われる。1945年にW. J. Kolffが、セロファン膜を用いた「回転ドラム式」人工腎臓での救命に成功して以来、血液人工腎臓が多く使用されるようになり、最近では内径が約200 μ mの中空状多孔体繊維（中空糸膜）を利用した血液透析器が人工腎臓として主流となっている。

この血液透析療法により、多くの人々が救われ、現在では透析療法を受ける人は国内で25万人を越えるようになった。また、人工腎臓の使用量も国内で年間約3000万本を越え、人工臓器の中でも産業化に成功した一例といえる。しかし、一方で血液透析療法を10年以上受けるような長期透析患者が増加し、骨・関節異常、末梢神経障害などの合併症が出現してきている。

このような背景により、現在の人工腎臓の研究・開発は、救命・延命からQOL(Quality of Life)の向上へと関心が移りつつある。しかしながら、原因物質として注目された β_2 -microglobulinについても、この濃度だけが病態に関与しているわけではなく、単純な除去のみで人工腎臓としての機能が完成されるわけではない。また、透析治療時に引き起こされる酸化ストレスについても、問題視されてきている。

本章では、まず、血液を介した治療に人工材料を用いる場合の大きな障害である抗血液凝固の極限を追求した抗血栓性持続除水人工腎臓システム研究開発を例示し、生体がデバイス中で負荷されるストレスについて検討した。さらに、ストレス負荷条件における患者の血液状態に関する研究成果に基づいて既存治療の問題点を示し、生体機能に学んだ新規な人工腎臓開発の必要性について述べる。

(1) 抗血栓性人工腎臓システム

急性腎不全の患者の多くは、出血傾向や出血性病変を有しており、長時間、抗凝固薬を投与し続けることは危険である。このような患者に対して抗凝固薬を必要としないかあるいは極く少量の使用で治療を行なえる抗血栓性持続除水システム (Antithrombogenic Continuous Ultrafiltration System: ACUS) を開発した。トータル・システムとしての ACUS の技術ポイントは血液が接触する全内表面積の約 9 割を占める中空糸膜の抗血栓性システムの開発と、他の血液接触部位も血液に対してストレスを与えないように工夫したシステムを完成させることであった。本人工腎臓システムの研究開発は東レ株式会社と新潟大学医学部および新潟県内の医療機関との共同研究にて進められ、筆者は中空糸膜に用いる抗血栓性ポリマーの設計・合成および中空糸膜の構造解析を担当した。ここでは、担当部分を中心に、全体のメカニズムについての検討結果を中心に報告する。また ACUS の臨床評価で得られた性能ならびに血液適合性に関する知見も合わせて報告する。

(2) 新しいタンパク質分離デバイスの研究と臨床プロテオミクス活用

臨床プロテオーム解析は、血液中のタンパク質を解析することにより、患者の病気の診断および患者にとって副作用のない薬の選定を可能とする技術として期待されている。

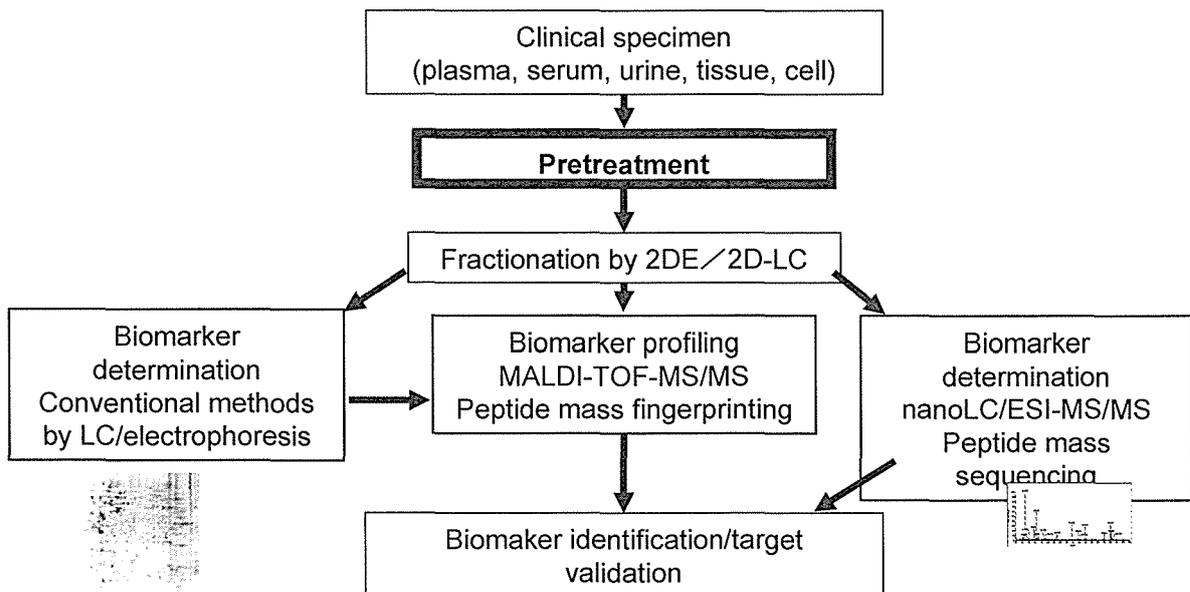


Fig. 1-1 analytical procedure for proteomics

Fig.1-1 に臨床プロテオームの解析手順を示した。血漿や血清などをはじめとする臨床サンプルは、高感度の分析を行うために通常「前処理」と呼ばれる処理を行い、目的とする成分を含む分画に精製する。その精製処理を行った後に、タンパク質を同定する MALDI-TOF-MS/MS 法や nanoLC/ESI-MS/MS 法などによって、血液中や細胞中のタンパク質を同定し、患者の病態解析や、新規薬物の開発を行う。Fig.1-2 に血液中のタンパク質の割合を示した。研究開発の指標となる患者特有の微量タンパク質を同定するためには、Albumin などの必ず存在しているタンパク質は高感度分析に対して不要な不純物になってしまう。図に示したタンパク質は、どれも必ず存在しているタンパク質であり、ターゲットとなる微量タンパク質は全体の 1%未満である。したがって、高感度な分析を行うために、分析の前処理として血液からこれらのタンパク質を取り除くことは必須であり、多量に存在するタンパク質を除去したのち、2次元電気泳動(2DE)もしくは2次元の電気泳動を(2D-LC)を行った後に質量分析による解析を行う必要がある。

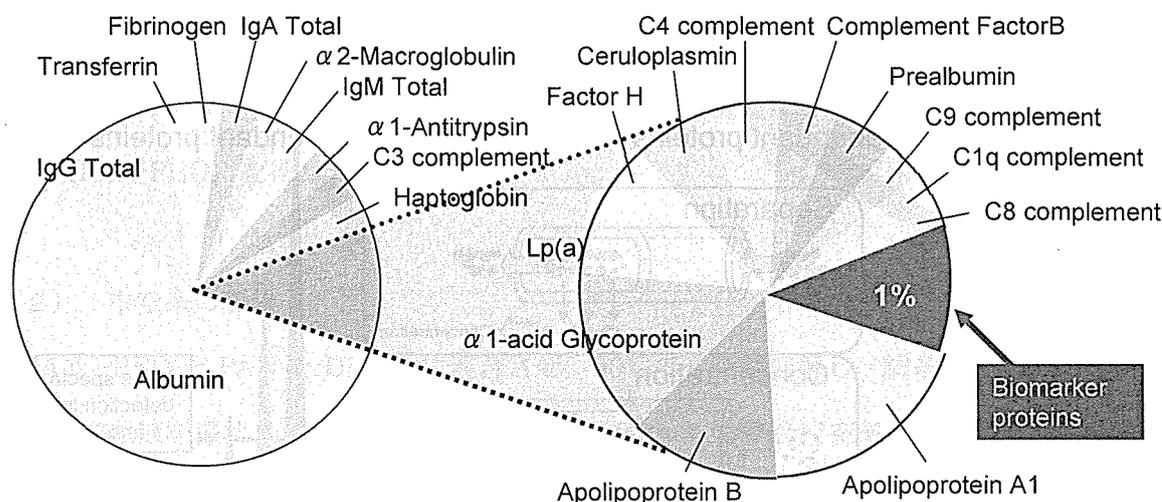


Fig. 1-2 Relative quantity of plasma/serum proteins

従来より、タンパク質の前処理用デバイスとして、ディスクフィルター型のタンパク質分画フィルターや遠心チューブ型のタンパク質濃縮器が主に研究用として市販されている(販売会社としては、Millipore 社や Whatman 社等)が、これらはいずれもプロテ

オーム解析のための十分な分離性能を備えておらず、現状は欧米の会社を中心に市販されている抗体を用いた Albumin を主とする特定のタンパク質の吸着カラム (Agilent 社等) が主流となっている。しかし、抗体で取り除けるタンパク質の数には限りがある。すなわち、これらは、分画性能、濃縮性能、微量検体への対応性ではまだまだ不十分で、質量分析装置と組み合わせて使うには難がある。

そのため、臨床プロテオーム解析分野においてはタンパク質を大きさ別に分離可能な膜分離システムの開発、つまり高度 (ナノサイズレベル) に膜のポアサイズ (孔径) をコントロールし、タンパク質の吸着を極限まで抑えられる技術の開発が強く求められている。筆者らは、これらを解決するために、分析の障害物質を除去するシステムの考案を行い、タンパク質を分画するシステム (HFMD) を完成させた。Fig.1-3 にその HFMD システム概念図を示す。本システムでは Albumin などの高含有量タンパク質がいずれも高分子量であることに着目し、分離膜を用いて低分子量タンパク質のみを透過させ、さらに、細かい濃縮膜によって水を除去し、高濃度に濃縮された特定領域のタンパク質を回収するという

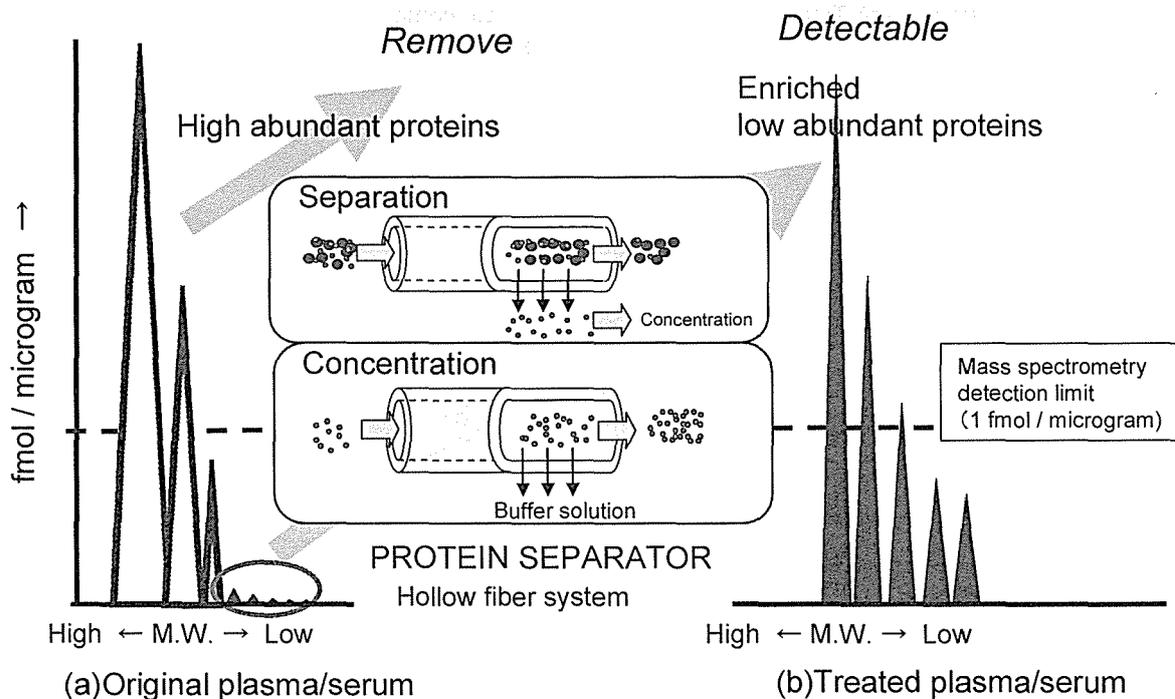


Fig. 1-3 Principle of separation and concentration of LMW proteins

システムである。

本研究では、分画システムの研究を行うとともに、このシステムを用いて、腎不全患者の血液のプロテオーム解析を行い、ストレス負荷された腎不全患者の血液が、いかに正常な状態から逸脱しているのかを明らかにした。

1-2 実験

1-2-1 抗血栓性人工腎臓システム

(1) ポリマーの合成

メトキシポリエチレングリコールメタクリレート” M900G” (エチレンオキシド部分の平均重合度 90, 重量平均分子量 4060, 新中村化学工業(株)製)をジメチルスルホキシド(DMSO, 東レファインケミカル製)に溶解した後、アクリロニトリル (AN, 三井化学製)と 2,2'-アゾビス-2,4-ジメチルバレロニトリル(ADVN)を加えて、窒素雰囲気下の密閉容器内で 41℃, 48 時間の条件にてラジカル重合を行った。このときの各成分の組成比(wt%)は M900G:AN:DMSO=9.6:22.4:70, ADVN は 0.05w%に調整して実施した。重合後、メタノール中で残留モノマーを抽出した後に 30℃で 48 時間真空状態にて乾燥させて、抗血栓性ポリマー (PAN-PEO) を得た。

(2) 中空糸の製膜

PAN -PEO と PAN を DMSO に混合させ、90℃で 6 時間溶解し、紡糸原液を得た。得られた紡糸原液を環状スリット型中空口金から、1.2g/min の割合で空気中に吐出した。同時に中空内部には窒素ガスを 30mmAq の圧力で注入した。乾式部分の長さは 4mm, 凝固浴には 47℃の水を用いた。水洗後 62%グリセリンで前処理した後、85℃75%のグリセリン水溶液で 5%の弛緩熱処理を行なって 19m/min でサンプリングした。

(3) 膜の構造解析

PAN-PEO 中空糸膜は電界放射型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) で、またオスミウム酸染色

した後、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。さらに、内表面から約 50 Å の部位での PEO の濃度および内表面から深さ方向への PEO 分布をそれぞれ X 線光電子分光法 (XPS) および二次イオン質量分光法 (SIMS) で測定した。

(4) 動物実験

正常な家兎およびビーグル犬においてヘパリンを全く投与せず、自然圧での体外循環を行ない、血小板数の変化と膜への血液成分の付着を既存の膜と比較した。

(5) 臨床評価

28 例の患者に ACUS 治療を処方し計 48 本の PAN-PEO 中空糸モジュールをヘパリンなどの抗凝固薬を投与せずに使用した。

1-2-2 タンパク質分離デバイス

(1) ミニモジュールの製作

ポリカーボネート製の直径 5mm, 長さ 12mm のケースに中空糸膜を 40 本または 100 本を組み込み、ポリウレタンを用いた遠心成形法にてモジュール化を行った。

(2) デキストランを用いた膜分離特性評価

Fig.1-4 に評価システム図を示した。FULKA 社製デキストラン Mw~1500(No.31394), Mw~6000(No.31388), Mw15000~20000(No.31387), Mw~40000(No.31389), Mw~60000(No.31397), Mw~200000(No.31398)を各々 0.5mg/mL (溶質全体では 3.0mg/mL) になるように蒸留水で溶解し、デキストラン水溶液 (原液) を作成した。

原液循環流量、濾過流量が所定の流量になるように流速を調整した。次いで、充填しているモジュールの濾液側の限外濾過水を廃棄した後、室温 (25°C) にて濾過を開始した。0分から4分後の液を採取し、その後も4分毎にモジュール原液入口、出口および濾液サンプルを採取した。通常は、4~8分後のサンプル液を用いて、ふるい係数を算出した。これらのサンプル中のデキストランの示差屈折率よりデキストラン濃度を測定し、これらの測定値からデ

キストランのふるい係数を算出した。

デキストラン濃度の測定は、次のように行った。サンプリングした溶液を細孔径0.5ミクロンのフィルターで濾過し、その濾液をGPC用カラム(東ソーTSK-gel-G3000PW_{XL})、カラム温度40℃、移動相を液クロ用蒸留水1mL/min、サンプル打ち込み量100μlで分析を行い、示差屈折率計(東ソー社製 RI-8020)にてslice time 0.02min, base-line-range 4.5~11.0minで測定した。カラムのキャリブレーションは、測定直前に単分散のデキストラン (Fluka社製デキストランスタンダード No.31416, No.31417, No.31418, No.31420, No.31422) を用いて行った。キャリブレーションでは、各デキストランスタンダードをNo.31416, No.31418, No.31422とNo.31417, No.31420に分けて、各々0.5mg/mLに溶解し、各々のピークトップのretention timeと重量平均分子量をプロットし、指数近似曲線を求めることでretention timeと重量平均分子量の関係を求めた。ふるい係数は、モジュール原液入口の示差屈折率値 (C_i)、出口の示差屈折率値 (C_o)、濾液の示差屈折率値 (C_f) を測定し、以下の式によりふるい係数

(S_c) を算出した。

$$S_c = 2 C_f / (C_i + C_o)$$

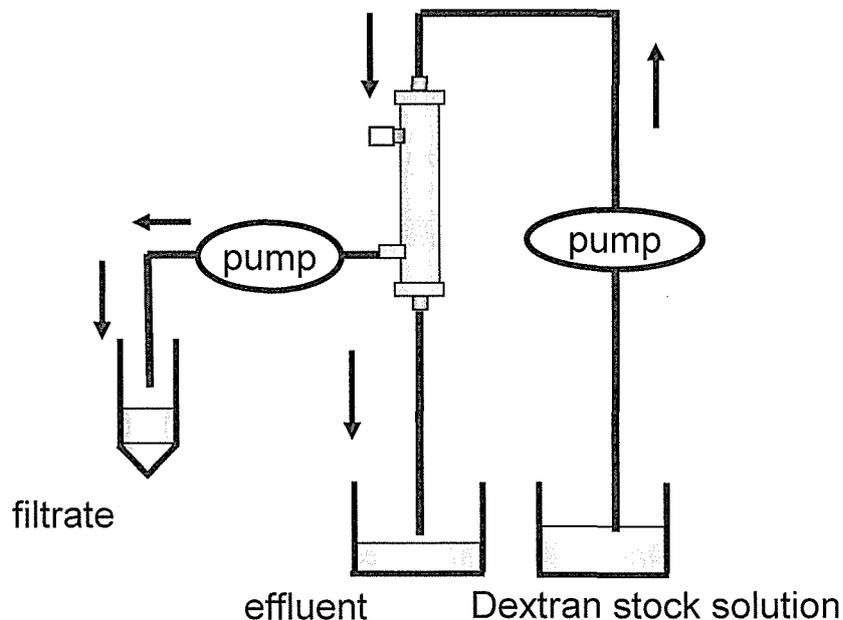


Fig. 1-4 Experimental Setup for Pore Size Characteristics of Membrane Filters

1-3 結果および考察

1-3-1 抗血栓性持続除水システム(ACUS)の設計

Table1-1 に、ACUS に用いた要素技術を、Fig.1-5 にシステム全体図を示した。ここでの、抗血栓性化の技術は大きく 2 つに分類される。1 つは抗血栓性材料技術であり、抗血栓性材料としての PAN-PEO ポリマーおよび抗凝固剤であるヘパリンを固定化した材料を採用した。本システムの全内表面積の約 9 割を占める中空糸膜は PAN-PEO コポリマーから作られており、Fig.1-6 に示すように、親水性のポリエチレングリコール (PEO) を含み、抗血栓性の特性を有するアクリロニトリル (AN) とメタクリル酸メトキシポリエチレングリコールとのコポリマー (PAN-PEO コポリマー) と、強度を向上させるためのアクリロニトリルのホモポリマー (PAN) からなるポリマーアロイ膜である。内径は $300\mu\text{m}$ であり、 0.25m^2 の面積のモジュールを作製して臨床評価まで実施した。ここで、PEO は共重合ポリマーにおいて、PEO の重合度と血小板付着との関係が研究されており、PEO 鎖が長い場合に優れた性能を示すことが報告されている (Mori et al.,1982) 。このため、本研究では PEO 鎖には重合度 90 のものを用いた。ヘパリンを固定化した材料は、膜以外の血液と接触するすべての部分に用いた。ヘパリンは生体中にある酸性ムコ多糖で、高い血液抗凝固性を有するため、抗凝固剤として最も広く使用されている物質である。このヘパリンを高分子鎖に結合させることにより、血小板の付着を抑制することが可能であり (Tanzawa et al.,1973) 、ポリ塩化ビニル鎖にジチオカブバマートを導入してメタクリル酸メトキシポリエチレングリコールとメタクリル酸 *N,N*-ジメチルアミノエチルを光共重合グラフトし、四級化して親水性カチオンマトリックスを合成し、コーティング後ヘパリンを作用させたカテーテルが製品化されている。本研究でのヘパリン固定化カテーテルには内/外径= $2.4/3.3\text{mm}$ のものを使用し、回路には内径 3.8mm のものを使用した。もう 1 つの抗血栓性技術は体外循環回路内の血流をストレスなく流す方法であり、タンジェンシャルヘッダーという血液をモジュールの側面から導入する方式の採用、各回路の接続部の段差の解消、患者から血液を取り出すチューブ器具であるカテーテルの挿入法の工夫を行った。システム全体の血液容量は 30ml であった。

Table 1-1 Designing of ACUS

Elementary Technologies	Elementary Parts
Antithrombogenic Materials/Surfaces	
PAN-PEO Polymer	Fiber Membrane
Heparinized Surface	Header Parts
Hemodynamic Modification	
Tangential Header	Tubing
Smooth Connection	Catheter
Catheterization	

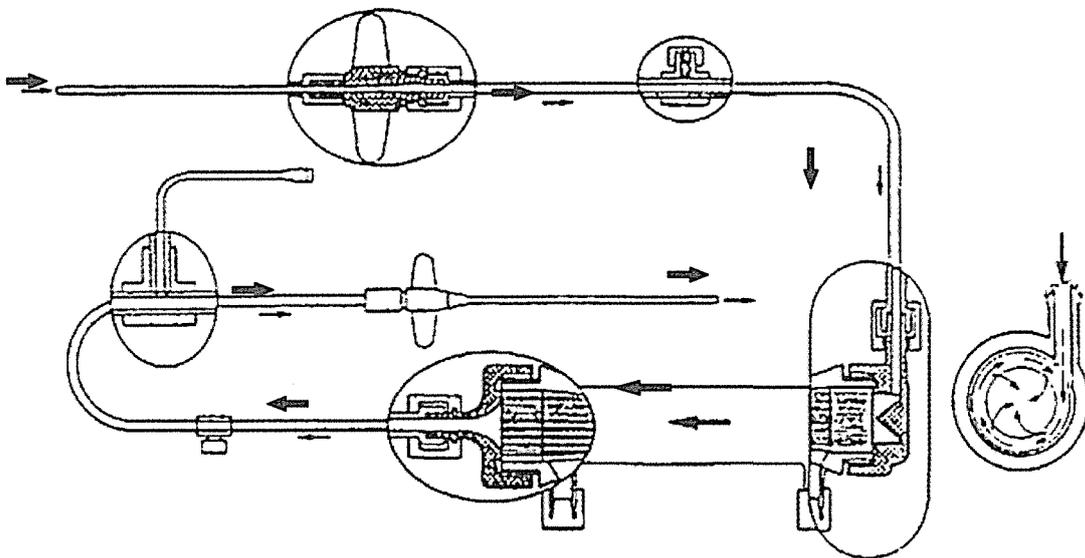


Fig.1-5 Flow scheme of ACUS, where arrows denote the direction of extracorporeal circulation.

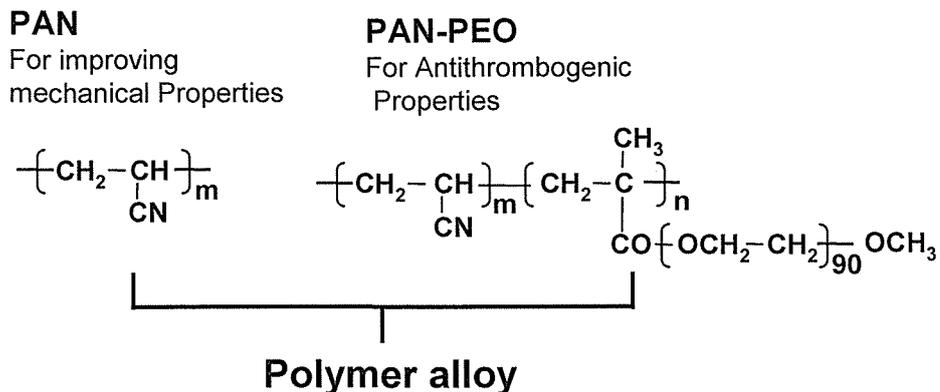


Fig.1-6 Chemical structure of PAN and PAN-PEO polymers used for preparing an antithrombogenic hollow fiber membrane.

1-3-2 PAN-PEO 膜の構造と抗血栓性

紡糸条件を変えることにより膜表面の構造が異なる種々の PAN-PEO 膜が作成できるが、F E - S E M で観察するとその内表面は粒子の形態をした相分離構造をとっていることが分かった。その粒子サイズと抗血栓性の指標としてのヘパリンを全く投与しないビーグル犬での体外循環時間との関係を Fig.1-7 に示した。表面の凹凸パターンが大きくなるにつれて、体外循環時間が短くなることがわかった。また、こうした相分離構造は抗血栓性と深くかかわる血小板付着にも大きな影響を及ぼして

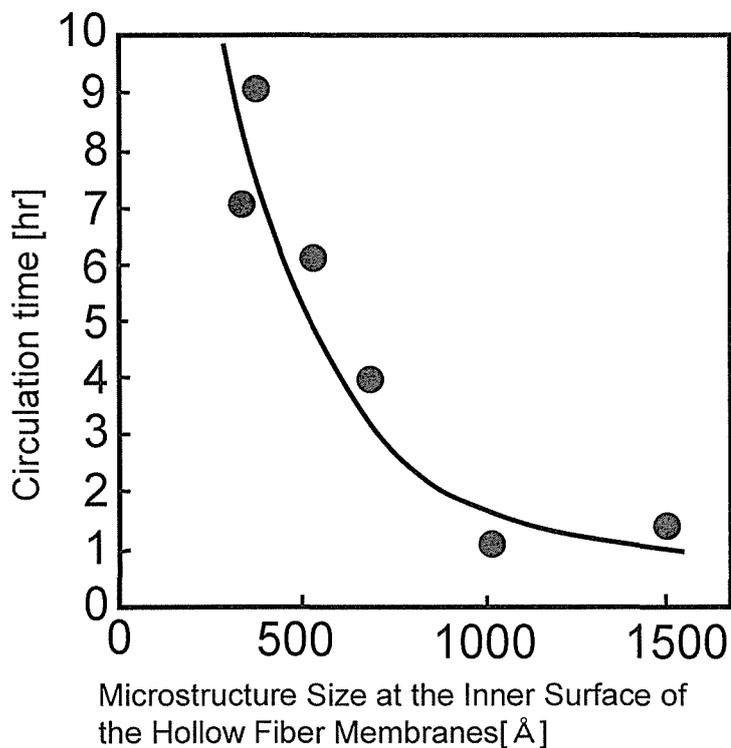


Fig.1-7 Relationship between the surface microstructure of membranes and circulation time in unheparinized dog model

おり、図には示していないが、体外循環時間が短いものほど血小板の付着が多かった。すなわち粒子サイズが約 500 Å 以下になるように製膜されたとき、安定な血液流量が維持できて体外循環時間が延長し、また膜内表面への血小板付着も抑制されることが分かった。

優れた抗血栓性を示した膜の構造をさらに詳細に調べると、Fig.1-8 および Fig.1-9 に示すような知見が得られた。すなわち、まず Fig.1-8 に示す膜断面の SEM および TEM 観察の対比から、約 300 Å 粒子から成る網目状微細構造の存在と内表面付近での高濃度の PEO の凝集（オスミウム酸で黒く染色されている）が示唆された。

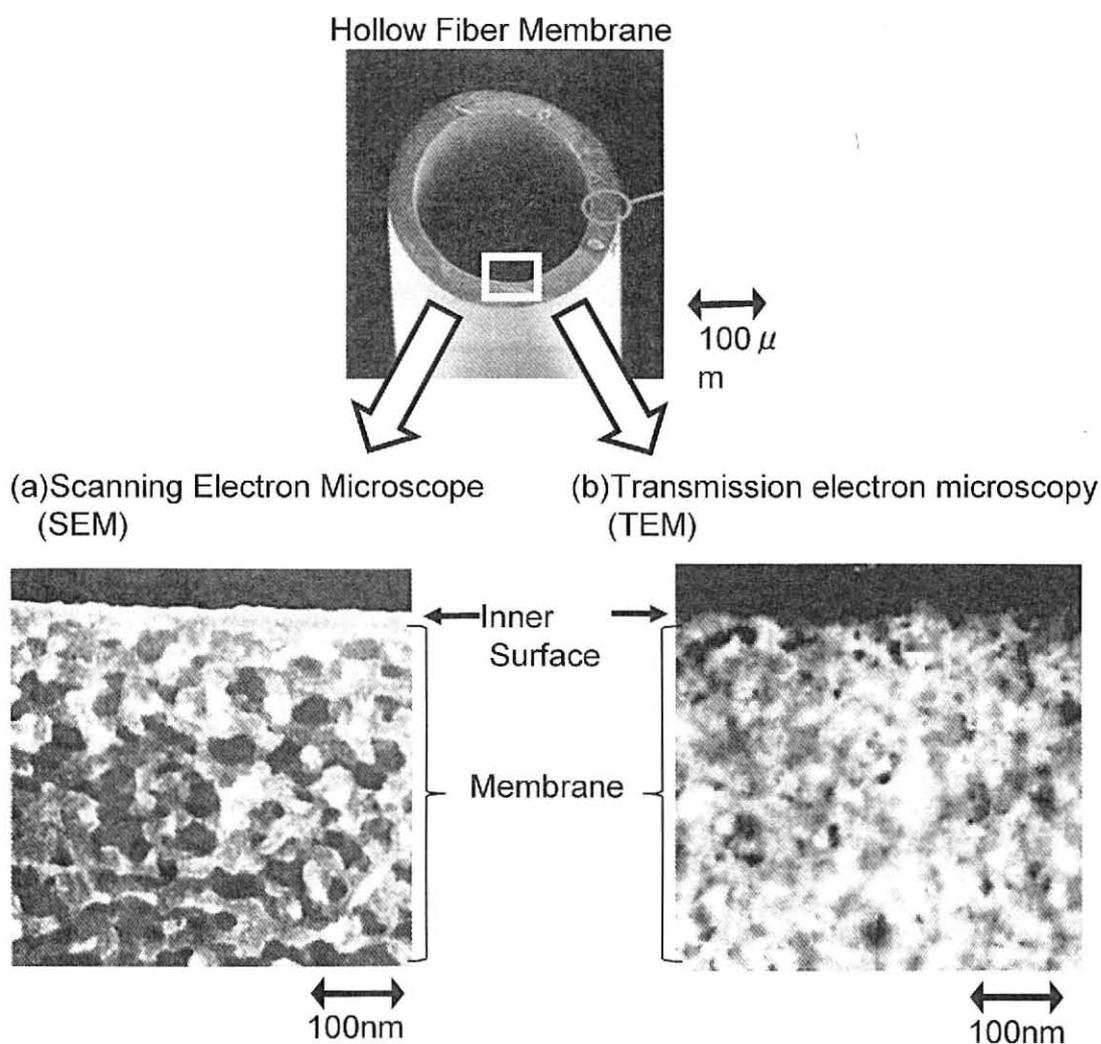


Fig.1-8 Cross section of PAN-PEO membrane observed by SEM and TEM

(a) Concentration of PEO at the inner surface (x-ray Photoelectron Spectroscopy: XPS)

45% (Depth 50 Å)
(Ave. = 18wt%)

(b) Depth Profile (secondary Ion Mass Spectrometry: SIMS)

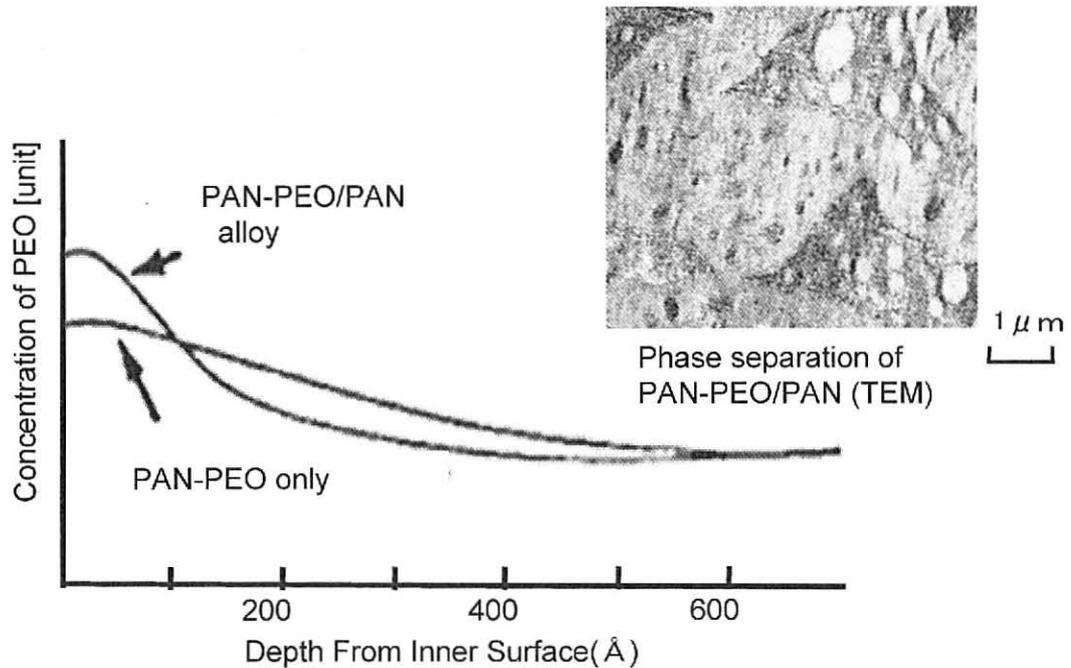


Fig. 1-9 Concentration of PEO near the inner surface of the membranes

また Fig.1-9 に XPS および SIMS による内表面近傍の測定結果を示した。膜中の平均 PEO 含有量は 18wt% であるが、最表層においては 45wt% を示し (XPS 測定)、PAN-PEO 中空糸膜の内表面付近に PEO 成分が高濃度に凝集していることを定量的に明らかにすることができた。また PAN-PEO コポリマー単独中空糸膜 (PEO 含有量は 18wt%) を作成し、PAN-PEO と PAN のブレンド膜を比較したところ、ブレンド膜の方が、表面に PEO 成分が集積しやすいことがわかった。図中に製膜前溶液の TEM 観察結果を示すが、同じ PAN 系のポリマーであっても、PAN と PAN-PEO は相溶せず、PAN 相と PAN-PEO 相とが相分離を起こす、このため、ブレンド膜において表層近傍にて PAN 相と PAN-PEO 相とが相分離を起こし、表面に集積しやすい PEO 成分が表面近傍にて濃縮したものと考えられる。

1-3-3 動物実験を用いた抗血栓性効果確認と要因分析

正常な家兎およびビーグル犬を用いて抗血栓性の評価を行った。ACUS システムに関しヘパリンなどの抗凝固剤を使用しない条件下で犬を用いた体外循環実験を行った。

システムを I.カテーテルと回路, II. モジュール・ヘッダー, III. 中空糸膜の 3 つに分け, それぞれを既存技術のエレメントを使った場合 (C) と本システムエレメントを使った場合 (M) で組み合わせを作り体外循環可能な時間を測定した。結果を Table 1-2 に示したが, すべて既存技術のエレメントからなるシステムの場合はコントロールとしての体外循環可能時間は, わずか 30~40min であり, 血栓形成のため血流が停止してしまった。また, 部分的に本技術エレメントを使った場合には, 多少改善効果は出るがどの組み合わせも 100min しか循環させることはできなかった。これに対して, システムすべてのエレメントに本技術を使うと 500min 近くまで, 循環時間が飛躍的に増大するという結果が得られた。すなわち, 血液を体外循環させると, 改善していない部分に異常な凝固反応ストレスを受けてしまい, それが起因となって, 全体の性能が規制されてしまうことがわかり, 全体にわたって生体適合性の高いものでなければならないことを定量的に確認することができた。

Table 1-2 Comparison of extracorporeal circulation time in dog model

Description	Combination of elements			Extracorporeal circulation time without heparinization (min)		Correlation of results with those of totally modified version
	Elements			Mean±SD	n	
	I	II	III			
Control	C	C	C	30,40	2	-
Partially modified	C	C	M	55±21	6	p<0.005
	C	M	C			
	M	C	C	45±21	5	p<0.005
	C	M	M	50±23	3	p<0.005
	M	C	M	70±49	6	p<0.005
	M	M	C	99±82	4	p<0.05
Totally modified	M	M	M	458±302	24	-

C, Conventional; M, Modified. Elements: I, catheter and tubing; II, header (inlet, outlet) and surface of potting material; III, fiber membrane.

1-3-4 臨床での持続使用検討

臨床にて凝固薬を使わない状態でどの位人工腎臓として機能したかを示したのが Fig.1-10 である。48本の人工腎臓を急性の腎不全患者に適用し、持続ろ過時間はモジュール当り5～217時間、平均34時間であり、12時間以上機能したものが75%あった。現在の持続式人工腎臓では、抗凝固剤を使用しないと、数時間で使用できなくなってしまうことから、画期的な持続治療として十分な効果が得られたと考えている。しかしながら、このシステムを用いても、数時間で使用できなくなってしまう、システムを新しいものに交換しなければならない例がみられる。血液凝固反応は、いったん大きく進んでしまうと、現在の技術では抑制することができないため、より均一な親水性表面を有する材料設計を行うか、もしくは、これらの暴走した反応を抑制するような機能を材料に持たせることが、完成度の高いシステムとして必要であることが課題として明らかとなった。

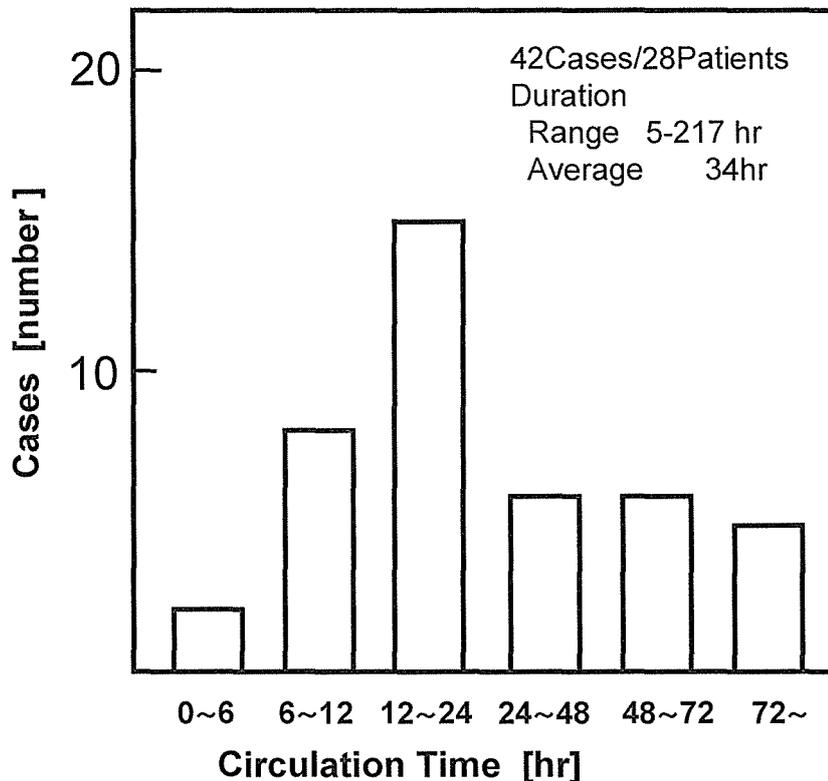


Fig. 1-10 Distribution of duration time of PAN-PEO filter modules clinically used.

1-3-5 タンパク質分離用中空糸膜の分離特性

次に血液成分の解析を行うための前処理システムの開発を試みた。まず、分離特性の評価方法を示す。タンパク質分画デバイスの鍵となる中空糸の分離特性は、デキストラン水溶液を用いて実施した。Fig.1-11 にデキストランでの分離特製の生データと解析結果を示した。複数種類のデキストランを原液として送液し、濾過されたろ液とモジュールをそのまま通過した廃液に分けることができる。Fig.1-11(a)の生データからわかるように、ろ液の溶出時間は遅く、しかもより遅く出てくる低分子量成分はほぼ原液に重なっている。これらの濃度から、各分子量ごとに計算を行い、分子量毎のふるい係数(Sieving Coefficient)を求めることができた。

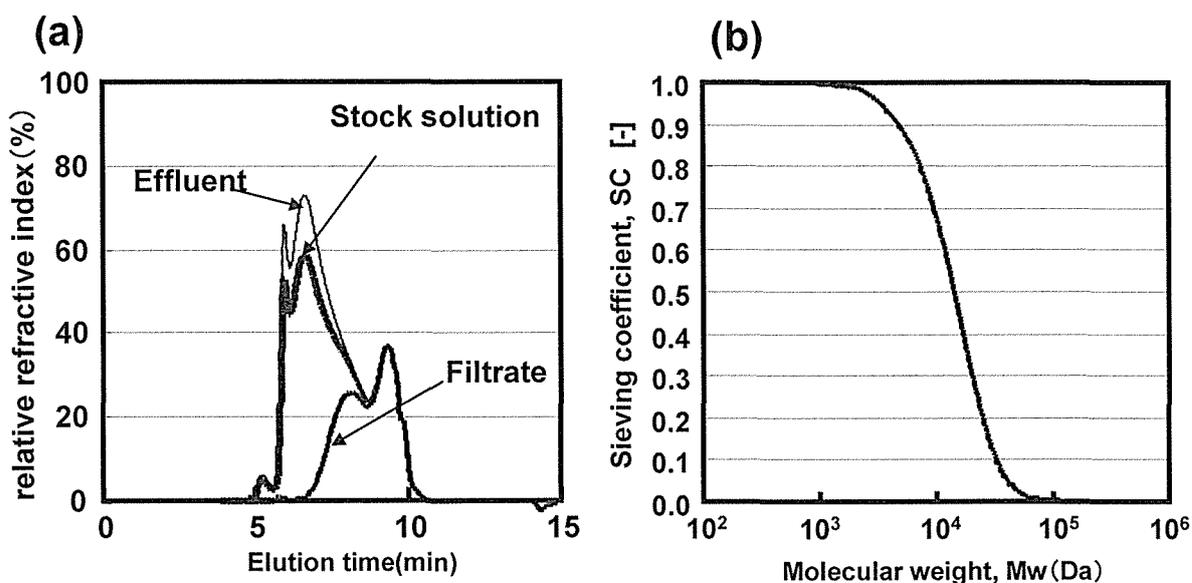


Fig. 1-11 Dextran sieving profile of the membrane.(a):GPC measurement profile of each solution.(b): dextran sieving profile for each Molecular weight.

1-3-6 多段分離システムによるタンパク質分画設計

Fig.1-12 に多段分離の回路図を示した。本システムでは、Albumin 濃度を 1 万分の 1 以下にするために、分離膜を多段に組み合わせて使用している。各段では、膜の目づまりを避けるために循環を行い、一定割合でろ過をかける。また、多段に分離した分画液を濃縮するた

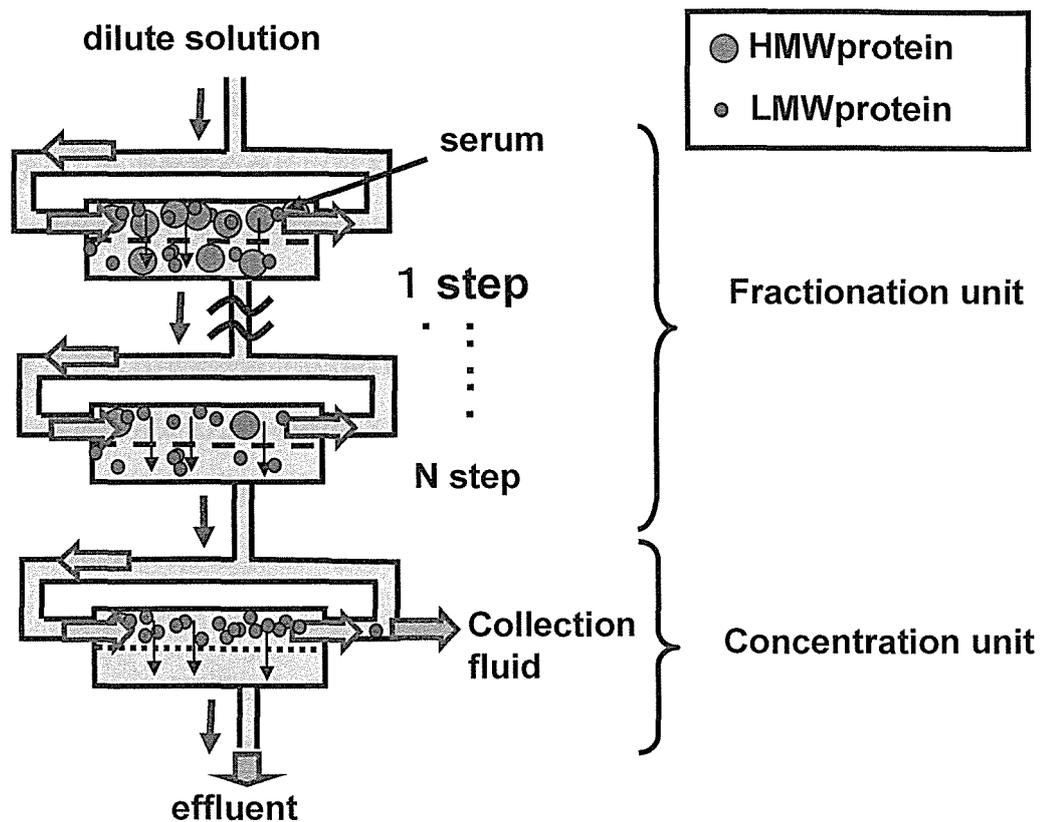


Fig 1-12 Multi-Stage filtration system

めに、最後のステップには高透水性であって、かつ分画したタンパク質などの成分を透過させない、ち密な構造を有する膜を濃縮膜として開発した。

Fig.1-13 は分離膜と濃縮膜の膜分離特性を示した。分離膜に対して、濃縮膜は約 1/10 の分画特性である。システムとしては、これらの膜の組み合わせによってこの中間領域の分子量を有する生体成分を回収することができる。

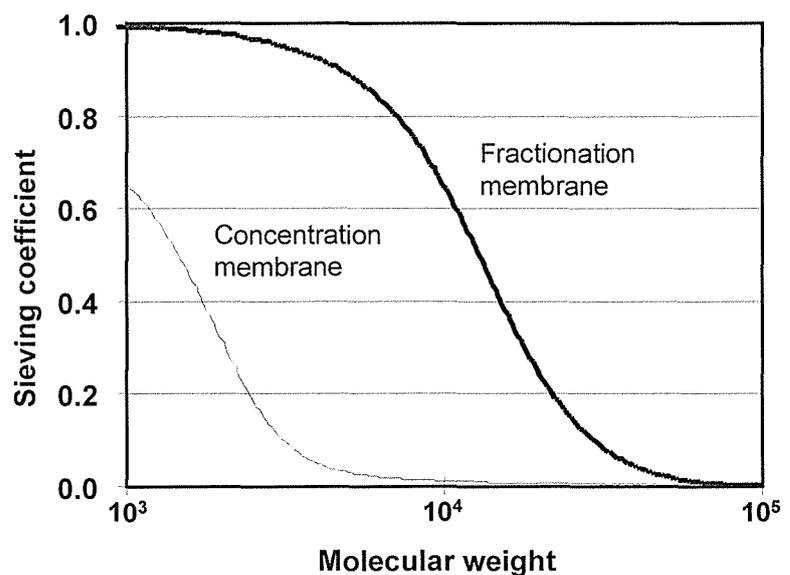


Fig. 1-13 Dextran sieving profile of the membrane

1-3-7 血清からの高効率タンパク質分離

Table 1-3 には、この分画システム (HFMD) の特徴を他の市販されている分離方法に対して比べた結果を示した。Albumin の除去率が高いという特長を有するうえに、多量の血液を短時間で処理できる。また、これ以上の量へのスケールアップも容易である。これは、他のシステムがカラム分離や抗体吸着、電気泳動などの吸着に関連する原理にて分離を行っていることに対し、本システムは膜分離の単位操作のみによって分離精製を行っているためであり、本質的に大量・高速処理が可能である。

Table 1-3 Proteins identified in dialysis patients

Device	Separation mode	Removal of Albumin	Capacity (serum, mL/operation)	Operation	Biohazard & Contamination
HFMD	High-performance membrane	Reduce up to 1/10,000-1/100,000 Concentrate low M.W. proteins to x 100-200 fold	0.5-5	1-2 hours Full automatic	Semi-closed One-use cartridge Sterile
Agilent affinity column	Ab affinity gel (HPLC)	> 99%	0.04	4-6 hours Manual	Open Re-use Non-sterile
Amersham removal kit	Affinity gel & Spin column	> 95%	0.015	2-3 hours Manual	Open Re-use Non-sterile
Electrophoresis (2DE, Non-carrier, etc)	Electrophoresis	> 99%	< 1	2-3 days Manual	Open Ready-made Non-sterile

Fig1-14 には HFMD を用いて血清を分離した結果を示した。左側が電気泳動法によるタンパク質パターンであり、右側はこの電気泳動ゲルを定量化した分布パターンである。最も高性能と言われている Agilent 社の抗体カラムと、同じ膜分離方法として平膜タイプでの遠心分離フィルター (Spin type filter) のデータを比較対照として採取した。分子量が 67kD 未満のタンパク質において、血清が 9.2% であることに対して、他のシステムでは約

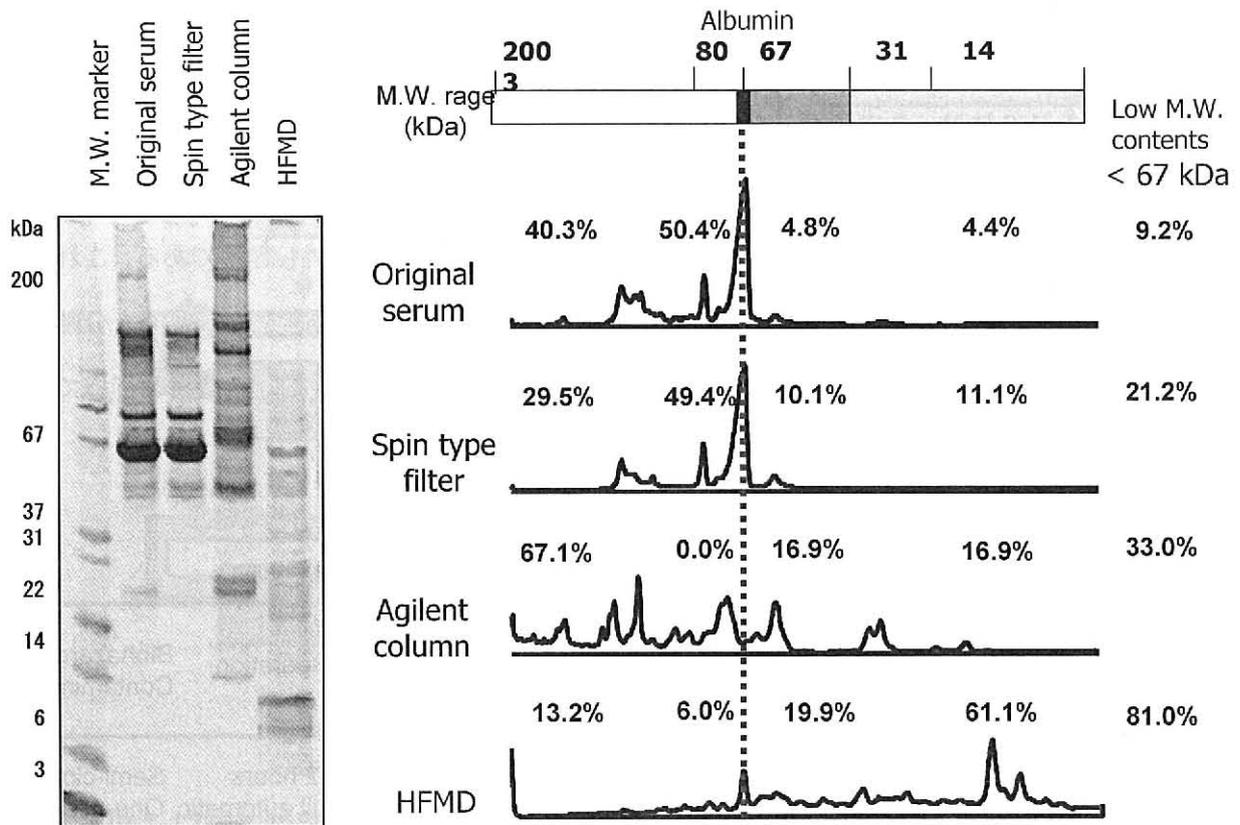


Fig 1-14 Difference in Electrophoretic Pattern

20~30%に濃縮することはできるが、まだ多くの高分子量タンパク質が残ってしまっている。これに対して HFMD では 80%以上に濃縮することができており、高分子量領域を劇的に低減することができている。左の写真でも多くのタンパク質を確認することが可能であり、市販システムに対して飛躍的に高い性能であることを確認できた。HFMD の性能特性値を Albumin と β_2 -microglobulin の濃度変化によって評価した結果を **Table 1-4** に示した。Albumin は血清中に 55%含まれているが、処理後は約 1 万分の 1 以下の量に低減することができており、処理後の全タンパク質中に占める割合も 1%未満である。一方、 β_2 -microglobulin においては、30%近く回収することができることから、全タンパク質中に占める割合は 1%を越えており、約 300 倍に濃縮することが可能であった。これは、市販の前処理用デバイスを凌駕する性能である。

Table 1-4 Selective concentration properties

	Original plasma		Recovered plasma		
	Total protein (mg)	Relative content (%) [*]	Total protein (mg)	Recovery (%) [*]	Relative content (%) [*]
Albumin (67kDa)	28000	55	0.3	0.001	0.5
			x 0.0091 fold		
β_2 -microglobulin (11.5kDa)	2	0.004	0.67	34	1.1
			x 275 fold		

^{*} Determined by ELISA

1-3-8 透析患者血液のプロテオーム解析

低分子量のタンパク質を高効率に抽出できることが確認できたため、実際の透析患者の血液の解析を行った。質量分析は、タンパク質解析を行う前にタンパク質を酵素（トリプシン）にてペプチドに切断してから行った。Fig.1-15 は健常人と透析患者の血液をデバイス処理の有無に分けて分析した時の液体クロマトグラフィー処理後のペプチドパターンである。デバイス処理がない場合は、健常人と患者の差は小さい。これは、Albuminをはじめとする、全タンパク質に占める割合の多いタンパク質のピークが支配的となるため、微量成分のピークが隠れてしまい分かりにくくなっているためである。一方、デバイスの処理を行うことによって、その差は明確になり、患者においては健常人には見られないピークが非常に多く観察されていた。

Table 1-5 は分画したタンパク質を実際の質量分析機にかけて、タンパク質を同定した結果である。タンパク質を切断したペプチドを用いて質量分析を行うと、得られた分析結果とタンパク質のデータベースから、存在することが確からしいタンパク質をスコアとして求

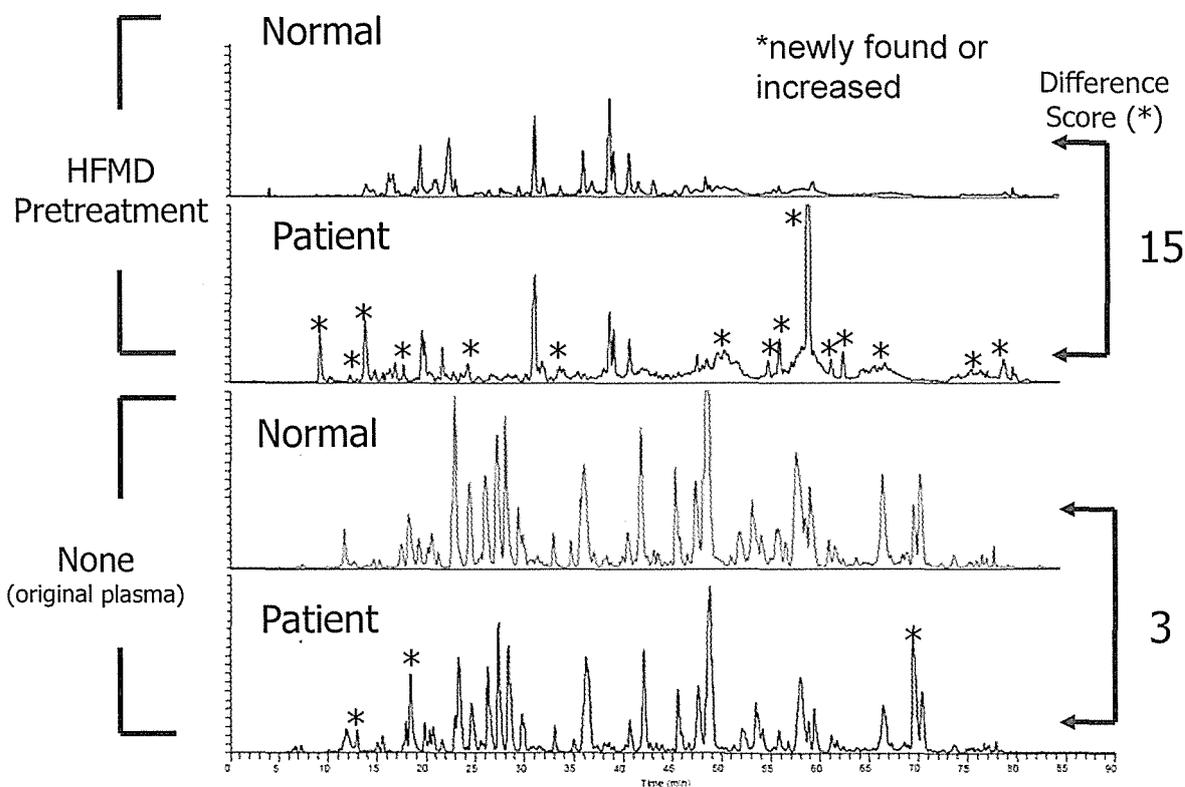


Fig.1-15 Pretreatment effect of HFMD

めることができる。表には、健常者に対して、透析患者の方が多く含まれているタンパク質を挙げ、従来の非プロテオーム手法からの論文報告例も示した。この表にて明らかなように、従来は一つ一つの物質に着目して、抗体などを作製しつつ研究を進めるしかなかったが、この方法を用いることにより、一度に異常な状態にあるタンパク質をリストアップすることが可能になった。

また、興味深いことに、Caldesmon など、この分離操作では検出されるはずのない高分子量タンパク質もいくつか観察されていることがわかった。おそらく、フラグメント化して血液中に存在し、このフラグメントが分画・検出されたのではないかと考えられる。このこととは、フラグメント化している状態で、多くのタンパク質が、血液中に存在していることを示唆している。フラグメント化しているタンパク質は、本来の構造ではないことから、他の物質、細胞などと結合しやすく、悪い影響を及ぼしやすい強いストレス状態であるとも考え

Table 1- 5 Proteins identified in dialysis patients

Protein	Mw	Reported information
Beta-2-microglobulin	13829	High level
Plasma retinol-binding protein(PRBP)	23386	Detected in urin
Heparin cofactor II (HC-II)	57242	Low activity
Complement factor D	27517	normal: 1.02 ± 0.11 ug/ml, ESRD: 12.12 ± 2.38 ug/ml
Myoglobin.	17110	High level
Macrophage colony stimulating factor-1 (CSF-1) (MCSF)	60804	ESRD;preHD: 1287± 380 U/ml (2.4times by normal), ESRD;postHD: 1644± 456 U/ml
Caldesmon (CDM).	93307	
Guanylin (Guanylate cyclase activator 2A) (Guanylate cyclase Activating protein 1) (Gap-I)	12848	High level
Thioredoxin (ATL-derived factor) (ADF) (Surface associated sulphhydryl protein) (SASP).	11892	normal: 28.0±5.4ng/ml, ESRD;HCV+: 112.3±3.7 ng/ml, ESRD;HCV-: 69.7±3.3ng/ml
Osteopontin(Bone sialoprotein 1) (Urinary stone protein) (Secreted phosphoprotein 1) (SP1)	35594	normal: 315.1±117.4ng/ml ESRD: 837.3± 443.2 ng/ml

られ、いかに、この変性状態を改善するのかが、将来の人工腎臓としての課題として明確となった。

この他にも、われわれは、透析患者の血液に対する研究を行い、健常者と大きく異なることをいくつか明らかにしている。例えば、**Fig.1-16** には、透析患者の血液が肥満細胞に与える刺激を調べた結果を示した（山田他,2004；菅谷他，2005）。透析患者および健常者の血液を液体クロマトグラフィーを用いて分子量ごとに細かく分画・分取し、各サンプル別にラットの肥満細胞に接触させて細胞からヒスタミンが遊離する割合を測

定したところ、透析患者において、分子量が16万近傍の分画成分に非常に強い刺激性があることがわかった。

分子量が16万であることから、抗体であることが考えられるため、抗体カラムを用いて、抗体と抗体でない分画に分けて、ヒスタミン刺激を確認したところ、驚くべきことに、この刺激成分は抗体成分ではなく、界面活性剤などで解離する会合体であった。すなわち、抗体などの分子量16万の単独タンパク質ではなく、複数の種類からなる混合物であることがわかった。さらに界面活性剤で分離した成分を2次元電気泳動法にてタンパク質のパターンを解析したところ、Fig.1-17に示すように、全く異なるパターンを示した。特に図中に示したImmunoglobulinのkappa chainやApolipoproteinでは透析患者においてはパターンがブロード化しており、末端変性もしくは構造異常が起きていることが示唆された。これらの物質は、血液中では会合して大分子量として流れているために通常の透析膜では除去することができなかつたと考えられる。これらの刺激成

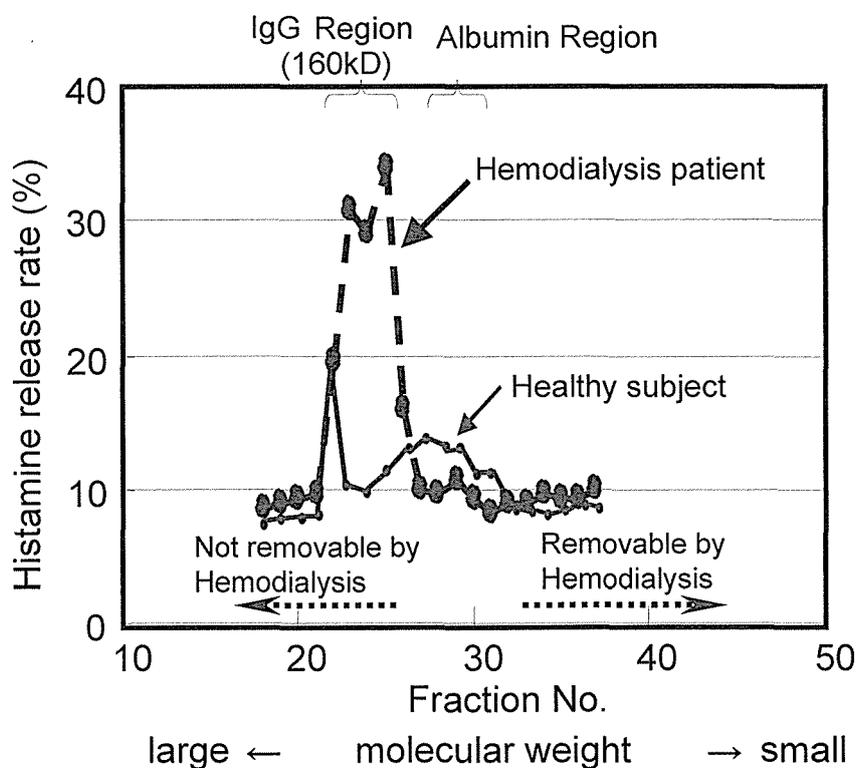


Fig.1-16 Isolation of Mast Cell degranulation factor from hemodialysis patients with pruritus

分はポリメタクリル酸メチル(PMMA)の膜素材に良く吸着することもわかっているが、正常化させるためには、この吸着型の人工腎臓でもその効果は十分とは言えない。したがって、これらの異常タンパク質を低減させるためには、生体の持つ機能の助けが必要であり、具体的には、リポソームの有する機能を活用して、会合体の抑制機能、もしくは、 β_2 -microglobulinをはじめとした構造異常が起こったタンパク質の正常化機能を活用する必要があると考える。

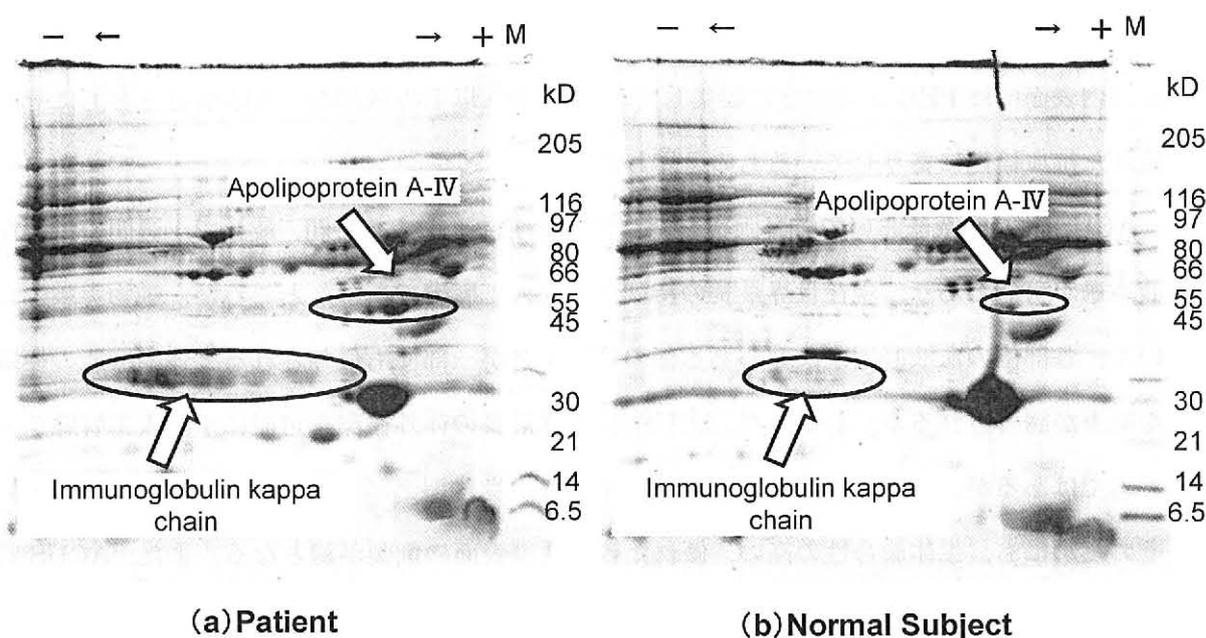


Fig.1-17 Difference in electrophoretic pattern between dialysis patient and normal subject

1-4 まとめ

人工腎臓の改良研究と腎不全患者の病態に関する研究について述べた。血液の凝固反応を抑制し、さらに血液にストレスを与えないように流れを工夫した中空糸膜モジュールシステムを創製したが、その一部でも不完全であると抗血栓性機能の極端な低下が誘導される事が

わかった。これらを解決する次世代型デバイスを構築するために、生体適合性の高い、優れた親水性膜表面の創製が鍵となり、また、腎不全患者の非常に強いストレス環境下で受けている血液の特殊性を鑑みると、人工膜に使用される高分子を Build-Up 型で設計する手法に併せて、(モデル)生体膜(リポソーム)の機能利用をコアとする腎機能 Break-Down 型の設計手法の必要性が示された。

抗血栓性人工腎臓システムの研究においては、PAN-PEO 中空糸膜とヘパリン化材料を用いたパーツとを組み合わせ、血液がスムーズに流れるデザインを取り入れることにより、抗血栓性に優れた持続人工腎臓システム、ACUS を設計した。ここで、PAN-PEO 中空糸膜の内表面には PEO が高濃度に凝集しており、500 Å以下の微細な相分離構造とともにその優れた抗血栓性に寄与しているものと思われた。

ACUS は臨床系において抗凝固薬を全く使用せずに平均 3 2 時間、最長で 1 週間の持続血液濾過が可能であり、現在世界最長の持続可能な人工腎臓である。ところが、動物実験において、各部位の血液凝固すなわちある種のストレスが一部でも付与されると体内機能の極端な低下が誘導される事がわかった。ACUS は世界最長の体外循環を可能にする人工腎臓システムではあるが、さらにストレス耐性を考慮した次世代型デバイスを構築する必要があり、そのためにも、生体適合性の高い、優れた親水性膜表面の創製が鍵となる。また、ACUS 膜はそれほど物質透過性の高い膜ではないので、最新のポリスルホン膜などへレベルの高い親水性を付与することが、重要な鍵、課題となる。

分離膜技術を用いた新しいタンパク質分離デバイスの研究と活用については、特定のタンパク質を数百倍に濃縮する多段分画デバイスの設計に成功した。これを用いることにより、従来にない微量の分析を行うことを可能とした。このデバイスを透析患者に適用し、質量分析機を用いてプロテオーム解析を行ったところ、非常に多くのタンパク質が切断・変性を受けて血液中に存在していることがわかった。また、細胞刺激性を与える成分は変成したタンパク質の会合体であることも示唆されるデータを得ることができた。すなわち、透析患者血液が過剰にストレスを負荷している現状が判明し、現在の人工腎臓はストレス負荷を低減できない不完全なものである事が明らかとなった。これを改善する画期的な治療法が必要であり、現在の人工物からの Build-Up 型で設計する手法には大きな限界があると考えられた。

これらの研究結果から、単なる除去膜から、(モデル)生体膜(リポソーム)の機能利用をコアとして、腎機能の一部を **Build-Up** し、さらに **Break-Down** する統合型タイプの膜の創成が必要であると考え、設計を試みることにした。ただし、これまでに、リポソームを含む人工腎臓の研究例はなく、まずは、リポソームが存在した場合に膜特性・透過性としてどのようなものが得られるのか、人工腎臓全体として流れを安定化させることができる設計ができるのかなどが具体的な課題として挙げられ、次章にて検討することとした。

第2章 親水性ポリマーの構造解析とリポソーム固定化デバイス設計に向けた基礎検討

2-1 緒言

前章において、リポソームの機能を活用した中空糸膜モジュールの創成に取り組むことの有用性が示唆された。ここでは、そこで課題として挙げられた、尿素や、水などの基本的な除去成分に対して高性能な除去特性を有する中空糸膜材料に関する基礎研究、および、リポソームを中空糸膜に適用した時の基礎的な特性（分離性能や、吸着特性など）、人工腎臓デバイスとして使用するときに必要なカラム特性シミュレーションに取り組み、新規な人工腎臓創成に必要なデータ・情報に関する基礎検討を行った。

(1) 親水性材料の創製

1章で議論された通り、人工材料は生体成分との吸着作用が強く、連鎖的なストレス応答誘導の原因となる。このため、まず親水性高分子を材料表面に修飾した既存の高分子膜表面の改質について検討した。より高性能な材料表面の創製のために、膜モジュール基材であるポリスルホン膜(PSf膜)表面をポリビニルピロリドン(PVP)により親水化処理し、高分子膜表面の水分子の解析、ならびに、タンパク質、血小板などの生体成分との相互作用の解析を行った。

(2) リポソーム充填中空糸膜での機能評価

これまでに、リポソームを含有する分離膜の研究例はなく、リポソームが分離膜中に存在した場合に膜特性・透過性としてどのようなものが得られるのかについてはほとんどわかっていない。リポソームについては、膜に固定化することを想定しているが、まずは、リポソームを充填した状態で、膜の透過性などに及ぼす影響について検討した。また、リポソームと膜が共存している環境において、リポソーム機能発現の可否も重要な確認項目である。ここでは、タンパク質などの血液成分の評価に加えて、次に説明する酸化・抗酸化に対する機能評価についても確認した。

スーパーオキシド (Superoxide)、過酸化水素、およびヒドロキシル・ラジカルなどの活性酸素種(ROS)の作用は、生物系の潜在的な機能を理解する上で重要な課題になりつつある。

それらは、低濃度条件では、各種代謝反応の活性化に寄与する事も報告されているものの、高濃度の条件で細胞の生体高分子を破壊する、あるいは、アポトーシスを誘導する可能性が示唆されている。

近年、腎不全患者への重篤な被害を誘導する可能性が示唆されており、血液透析とのROS (reactive oxygen species ; 活性酸素種) との関連性が注目されている。透析膜と白血球の接触はROSを発生する事が報告されており、動脈硬化などの多くの病気に関連している可能性が示されている (Jackson et al.,1995)。近年、透析膜の抗酸化特性を改善するために、ビタミンEによる透析膜の表面改質行われており (Suruhashi et al,1992)、臨床的にも酸化ストレスが軽減される知見が報告されている (Wratten et al.,1999)。また、リポソームとビタミンC・Eを添加した透析液を用いるHemolipodialysisにおいても、酸化的ストレス低減の効果が報告されている (Kobayashi et al.,2003)。しかしながら、従来の方法論では、非触媒的な抗酸化剤を利用しているために、いくつかの制限があることが示唆され、その課題を克服した新規な透析装置の開発が期待されている。

リポソーム (リン脂質二分子膜からなる閉鎖小胞) は、ナノオーダーの界面 (~5nm) が存在し、表面に水和層、および疎水性の低誘電層からなる事が知られている。これまでに、リポソームは、静電的・疎水性相互作用や水素結合の安定性などが複合した相互作用で分子認識することについて報告されている (Kuboi et al.,2000; Yamahara et al.,1998; Kuboi et al.,2006)。近年、ストレス条件下ではリポソーム膜自体の潜在的な機能が誘導される事が報告されている (Kuboi et al.,2008): (a) タンパク質のリフォールディングを解除する分子シャペロン様機能 (Kuboi et al.,1997; Yoshimoto et al.,1999; Umakoshi et al.,2007)、(b) タンパク質の脂質膜の透過機能、(c) 膜融合機能、(d) LIPOzyme機能 (リポソーム + 酵素) などである。リポソーム (または、LIPOzyme) を用いて、リポソームをコア材料とした新規な血液透析システムの設計・開発が期待される。

LIPOzyme機能を利用する新規な血液透析システムのために、中空糸膜モジュールはリ

ポソームを物理的に固定化するための強力なツールとなる可能性を有する。特に市販されているPSf中空糸膜は非対称の多孔質膜構造を持ち、リポソームをトラップするための有効な構造体である。即ち、リポソームを容易にそのような多孔性のスペースに充填固定でき、基礎的な特性を評価できるものと期待される。

本研究では、中空糸膜モジュールにリポソームを充填したHollow Fiber Liposome-Loaded Membrane (LLM)を作製した。リポソームは最初に膜のモジュールの多孔性のスペースに充填し、それを用いて、酸化して断片化しているSOD(Superoxide Dismutase; 超酸化不均化酵素)の分離について検討した。上記で調製した、SOD LIPOzymeを充填したLLMにおけるSOD様活性について調べ、リポソームを含む分離膜が人工腎臓に応用可能であるかを評価した。

(3) 人工腎臓のモジュール内流れ設計

最近の高透水性を有する膜においては、血液透析治療中に血液入口側で強い濾過が起こり、血液出口側近傍では透析液が血液に流入する逆濾過現象が起こっている。このような血液透析においては、血液入口側での強い濾過の影響により、 β_2 -microglobulinなどの小分子量タンパク質の除去性能は、単なる拡散のみが起こる血液透析に比べて向上する。最近、この現象を積極的に活用し、さらに高性能なダイアライザーを設計しようという試みがなされてきており、内部濾過促進型ダイアライザーと称されている。一方、生体適合性、ストレスとしてこの現象を考えた場合局所的にストレスが集中する現象は好ましくないと考えられる。これまでは、経験的にダイアライザーを作製し、臨床にて効果を確認してきたが、最近、臨床前にこれらの性能発現メカニズム解析を十分に実施しておかないと治験を実施することは倫理上許されなくなっている。したがって、この内部濾過現象を正確に把握することは、リポソーム固定化膜を研究する上でも必要な課題である。

内部濾過促進型ダイアライザーとして、中空糸内径を小さくしたもの、透析液流路に抵抗を設けたもの、ハウジングの径を小さくしたもの、ダイアライザー長さを長くしたものなどが考案されており(細谷他, 1995)、 β_2 -microglobulinなどの小分子量タンパク質の除去性能向上を可能としている。内部濾過型ダイアライザーを製品設計するためには、これらの

構造的な要素と中空糸の濾過性能の両者を把握し、最適化する必要がある。しかし、内部濾過現象が複雑であり、かつ内部濾過量の測定が困難であるために正確な計算ができず、計算結果の妥当性の検証も困難であった。これに対して、水溶液系でのモデル実験と理論計算、 γ カメラを用いた内部濾過量の直接測定などが試みられている(峰島他, 1999)。我々は内部濾過設計に必要な逆濾過データについて、牛血液系での実験により算出し、より精度の高いモデル計算を試みた。また、それらの基礎データを用いて、内部濾過促進型人工腎臓の限界と可能性について構造的な要素と中空糸の濾過性能の両面から予測した。また、それらの基礎データを用いて、ダイアライザーの長さの効果を調べた。

2-2 実験

2-2-1 親水性材料の物性評価と吸着挙動解析

(1) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定

SPR の測定には、BIACORE 社製「Biacore3000」を装置として、センサーチップは同社の「SIA Kit Au」を使用した。センサーグラムのシグナルは Resonance unit (RU) と表示され、1RU は $1\text{pg}/\text{mm}^2$ の表面濃度に相当するため、ここではこれを換算値として用いた。SPR チップ (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) の PSf 薄膜の調整は以下の手順で行った。PSf はアモコ製 P3500 を、溶媒にクロロベンゼン (Wako) を用い、0.1wt/vol% の濃度となるよう一晩攪拌にて溶解させた。センサーチップをスピンコーター (MIKASA) にセットし、PSf 溶液をパスツールピペットにて 1, 2 滴滴下した後すぐに、3000rpm, 1min の条件で PSf 薄膜を調製した。

SPR 測定では、まず金膜のみのセンサーチップを Biacore3000 の「Run sensorgram」にてシグナル強度を測定した。続いて PSf 薄膜を調製し、センサーチップに残存液滴が無いことを確認した後、シグナル強度を測定した。各種ポリマーの溶液を添加した後は、TritonX-100 水溶液 (0.025vol%) (以下、Triton 水溶液) を添加し、PSf 薄膜のベースラインと同程度になり、この条件で各種ポリマーが剥離されることを確認した。

このセンサーチップを装置に挿入し、2000秒間センサーチップを水洗浄した後、各種ポリマー水溶液を $20\ \mu\text{L}/\text{min}$ で $750\ \mu\text{L}$ 流して PSf 表面に吸着させた。2000秒間水洗浄後、Triton水

溶液を20 μ L/minで750 μ L流し、吸着させた親水性高分子を剥離させた。PSf表面への吸着量は、センサーチップ挿入直後に2000秒間水洗浄した後の値を0として、洗浄後の値との差とした。タンパク質の吸着測定も、同様の方法でポリマー水溶液の代わりにタンパク質水溶液を用いて実施した。

(2) 示差走査熱量測定 (DSC 測定)

セイコー社製 DSC6200 を用いた。試料皿の重量を測定した後、10wt%のポリマー水溶液を添加した。その後、80°Cの乾燥機に入れて、水を蒸発させることで、水分率を調節した。試料皿の蓋重量を測定した後、シーリングした。

DSC は、-100°Cまで冷却し、25°Cまで昇温速度 5°C/分でデータサンプリングした。DSC 測定後の試料皿重量を測り、この値を DSC の測定値と対応した水分率とした。

各種水分率について測定を行い、添加水量と観測水量をプロットし、該直線を外挿して得られた値を不凍水量とした。さらに、ピーク分割により、0°C付近 (0 \pm 1°C) のバルク水のピーク以外を中間水とした。バルク水が観測された領域は、中間水が飽和に達している領域であるので、バルク水が観測されたデータについて平均値を取り、中間水量とした。

(3) 誘電分散解析

誘電分散スペクトル測定には複素誘電率の計測が可能である Agilent 社製インピーダンスアナライザー(4291B)を用いた。複素誘電率の実数部分は比誘電率(ϵ')に、虚数部分は誘電損(ϵ'')に対応する。装置の校正にはキャリブレーションキット(open, short, 50 Ω , lowpass)の他に水、メタノール、エタノールを用いた。比誘電率に関して、文献値との差が相対誤差 4%未満になれば校正完了とした。目的サンプルを測定する前に、300MHz 付近で単一緩和が見られる 1,4-ジオキサンの誘電スペクトルを計測し、従来の知見と一致することを確認した。ポリマー水溶液 150 μ l をインピーダンスアナライザーのセルに導入し、1MHz から 1GHz の範囲で複素誘電率を測定した。複素誘電率の周波数依存性は Debye の式により解析した。

$$\epsilon' = \Delta\epsilon_1/(1+(f/f_{c1})^2) + \Delta\epsilon_2/(1+(f/f_{c2})^2) \quad (1)$$

$$\epsilon'' = \Delta\epsilon_1(f/f_{c1})/(1+(f/f_{c1})^2) + \Delta\epsilon_2(f/f_{c2})/(1+(f/f_{c2})^2) \quad (2)$$

ここで、 $\Delta\epsilon_1$ 、 $\Delta\epsilon_2$ は第1および第2緩和幅であり、 f_{c1} 、 f_{c2} は対応する緩和周波数である。

(5) ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)/多角度レーザー光散乱光度計(MALLS)測定

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 法は分子サイズの違いにより、高分子鎖の分離を行う液体クロマトグラフィーの一種である。この装置に、多角度レーザー光散乱光度計 (MALLS)を組み合わせ、サイズ分別された分子鎖溶液の光散乱強度を測定することにより、高分子量物質の絶対分子量分布を求めるものである。GPCは、Waters社製ゲル浸透クロマトグラフ、検出器はおなじく Waters社製示差屈折率検出器 RI410を用い、感度 $8 \times (50\%)$ にて使用した。カラムは東ソー社製 TSKgelGMPW-XLを2本接続し、溶媒には0.1M-NH₄Cl pH9.5を用いて、流速0.716ml/min、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、注入量：200 μl にて測定した。MALLSはWyatt Technology社製 DAWN-DSP型多角度レーザー光散乱光度計を用い、波長632.8nm(He-Ne)にて測定した。

(5) AFM測定

AFMを用いて、モデルフィルムもしくは中空糸膜表面の形態および表面の柔軟性を測定した。測定には、走査型プローブ顕微鏡 SPM 9500-J3 (SHIMADZU, Kyoto, Japan) を使用し、観察モードはコンタクトモード、プローブは NP-S(120mm, wide)(Nihon VEECO KK, Tokyo, Japan)、スキャナ標準は Standard(30mm x 30mm x 5mm)、走査範囲は 2mm x 2mm (画像の z スケールは 10nm に統一)、走査速度は 0.2Hz、画素数は 512 x 512 の条件にて行った。中空糸膜内表面の AFM フォースカーブを測定する際には、中空糸膜を試料台に貼り付けた後、純水を滴下し、中空糸膜が湿潤した状態で行うことを基本条件とした。

また、フォースカーブは、1水準あたり、20箇所点以上を測定した。膨潤層の厚みは、この平均値を取った。

2-2-2 リポソーム充填中空糸膜の作製

(1) 試薬 (リポソーム)

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC)はNOF社製を用いた。

(2) リポソーム調製

リン脂質はクロロホルム/メタノールで可溶化した。溶剤を減圧留去の後、得られた脂質薄膜を、少なくとも2時間、真空中で乾燥した。脂質フィルムは蒸留水ないし100mM calcein溶液によって水和されて、多重膜ベシクル (MLV) を調製した。MLV溶液は、凍結(-80°C)-融解(相転移温度以上)を5回繰り返す、100nmの孔径のポリカーボネートフィルタを用いて、粒径を調整した。

(3) 膜のモジュール操作

LLMの中空糸モジュールには東レ社製BS-1.6ULの中空糸を100本充填したものをを用いた。モジュールには内径2mmのシリコンチューブ回路に接続した。モジュールと回路の全容積は7mlであった。シリコンチューブの流路にperistalticポンプを装備して溶液を送液した。圧力計はろ液側に接続した。サンプルローディングの前に、緩衝液を用いて、膜モジュール内を洗浄した。リポソーム溶液は、0.5-2.0ml/minの流速で透析液側から血液端まで膜のモジュールシステムに導入した。圧力計は、膜の圧損をモニターするために、血液側に接続した。リポソームが中空糸膜モジュールに充填した後に、酸化・断片化したSODを、Cu/Zn溶液と共に充填した。リザーバーとモジュール出口におけるタンパク濃度を経時的に測定した。SOD様活性の測定では、WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]に伴うキサントリンとキサントリン酸化酵素混合物をLLMモジュール側に導入し、WSTから変換されたWST-formazanに由来する吸収を径時的に測定した。

(4) 分析方法

H₂O₂によるZn-SOD断片化：

Cu/Zn-SOD, (2 μ M)は, 12時間, 37 $^{\circ}$ Cのリン酸緩衝液(pH 7.4)でH₂O₂(2mM)と共に処理した. その後, 断片化しているSODの酵素活性とタンパク濃度を測定した. SDS-PAGEを用いて, SOD断片化を分析した.

SOD活性：

水溶性のtetrazolium塩, WST-1は, スーパーオキシド・アニオンにより水溶性のformazanを生成する. そこでは, O₂の減少速度はキサンチン酸化酵素(XO)活性に比例しており, SOD共存下ではその反応が阻害される. 450nmでWST-1 formazanの吸収スペクトルを測定した. そして, 着色の減少より, Formazan生成反応の阻害活性としてSOD活性を定量的に評価した. BCA Protein Assay Kitは, タンパク濃度を決定するのに使用した. タンパク質は, 夾雑物質を除去するために, 氷冷アセトン溶液で沈殿し, 20分間, 1万5000rpmで遠心分離の後に測定した. 反応液を試料と混合し, 30分間37 $^{\circ}$ Cで処理の後, 562nmでの吸収を測定した.

逆相HPLCのために, FCV-10ALポンプ, DGU-20A3デガッサー, SPD-10A UV-VS探知器, およびLC-10AD液体クロマトグラフからなる島津製作所社製HPLCシステムを使用した. UV測定はの220nmの波長にて行った. 流速は, 1mL/minに設定し, アセトニトリル/水(7/3:vol%)の移動相(25 $^{\circ}$ C)をカラムに導入した. カラムには 充填材粒子表面がOctadecyl化されたSTR ODS-Mカラム(0.46cm x15cm)を使用した.

2-2-3 正濾過係数, 逆濾過係数の測定と理論計算

(1) 理論解析

圧力, 流量, 物資移動に関して, 下記式を用いて計算を行った. 計算は東京女子医大の峰島三千男教授から, 計算プログラムを頂いて使用した. 今回は, 血液系での実験と精度の高い計算を行うために, Eq.(3),Eq(4)の流量計算式の改良を行い, 血液側から透析液側に濾過が

起こる正濾過領域については正濾過係数 (L_{pB}) を、透析液側から血液側に濾過が起こる逆濾過領域については逆濾過係数 (L_{pD}) を区別して用いた。

<圧力>

$$\frac{dP_B}{dz} = - \frac{128\mu}{\pi D'^4 N} Q_B \quad (1)$$

$$\frac{dP_D}{dz} = - \frac{32\mu}{de^2 S_D} Q_B \quad (2)$$

<流量>

a) $P_B - P_D - \Delta\pi \geq 0$ の場合

$$\frac{dQ_B}{dz} = \frac{dQ_D}{dz} = -JvA' = -L_{pB}A' (P_B - P_D - \Delta\pi) \quad (3)$$

b) $P_B - P_D - \Delta\pi < 0$ の場合

$$\frac{dQ_B}{dz} = \frac{dQ_D}{dz} = -JvA' = -L_{pD}A' (P_B - P_D - \Delta\pi) \quad (4)$$

<物質>

$$\frac{d(Q_B C_B)}{dz} = \frac{d(Q_D C_D)}{dz} = -N_s A' \quad (5)$$

ここで、

$$N_s = Jv S_\infty \{C_B \exp(\alpha) - C_D\} / \beta \quad (6)$$

$$\alpha = P_{cm} + \frac{Jv}{k_B} + \frac{Jv}{k_D} \quad (7)$$

$$\beta = (1 - S_\infty) \exp\left(\frac{Jv}{k_D}\right) \{ \exp(P_{cm}) - 1 \} \quad (8)$$

$$+ S_\infty \{ \exp(\alpha) - 1 \}$$

$$P_{cm} = \frac{S_\infty Jv}{P_m} \quad (9)$$

P は圧力, Q は流量, C は溶質濃度, $\Delta \pi$ は膠質浸透圧, J_v は濾過流束, S は流路断面積, L_p は濾過係数, A' は単位長さあたりの膜面積, D は中空糸内径, d_e は透析液側流路相当直径, N は中空糸本数, μ は粘度, N_s は血液側から透析液側への溶質流束, S_∞ は極限ふるい係数 ($=1-\sigma$, σ : staverman の反射係数), P_m は膜透過係数, k は境膜物質移動係数, z はダイアライザー長さあたりの距離をそれぞれ意味しており, 添字のBは血液側, Dは透析液側を表している.

(2) 正濾過係数, 逆濾過係数の測定

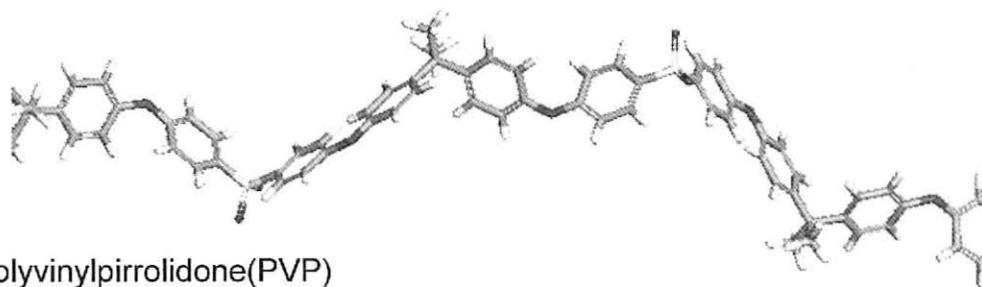
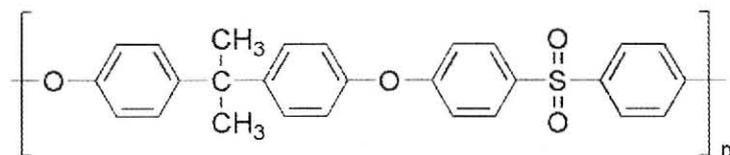
東レ社製”トスホン” BS-1.6UL を用いて, 正濾過係数, 逆濾過係数を測定した. 実験は「各種の血液浄化法の機能と適応—血液浄化器の性能評価法と機能分類 (透析会誌,1996,29:1231-1245)」(以下機能分類法と略す)に記載の回路を用いて実施した. L_{pB} , L_{pD} の値はトータルの濾過流量を-100ml/min から 50ml/min まで変化させてダイアライザーの入口, 出口圧力を測定し, 得られた流量-圧力のデータより数値解析を行うことで算出した.

2-3 結果および考察

2-3-1 PVP とポリスルホン膜の相互作用

Fig. 2-1 に今回用いた疎水性のポリスルホン (PSf) と親水性のポリビニルピロリドン (PVP)の化学式と分子計算によって求めた構造を示した. PSf は現在人工腎臓として, 最も多く使用されている素材である. また, PVP は相分離を安定化させる造孔剤として用いており, 同時に表面を親水性化させる機能を有している. ここでは, PVP で覆われた表面をモデル的に作成し, その表面特性と生体物質との親和性を調べた, ここで, PVP で覆われた表面を形成させるためには, お互いの相互作用を把握しておく必要があり, この解析から始めた. PVP は水溶性ポリマーであるが, PSf とも緩やかに相互作用し, 表面に吸着すると考えられる. その仮説を検証するために, PVP と PSf フィルムを用いたモデル実験を行った. モデル実験での吸着量測定には, SPR を用いた. SPR では分子がセンサー表面に固定されると, センサー表面とその上を流れる液体との界面の屈折率が変わり, 結果として反射光に生じる暗線の角度 (SPR アングル) が変わる. SPR アングルの変化は結合分子の質量変化に比例

(a) Polysulfone(PSf)



(b) Polyvinylpyrrolidone(PVP)

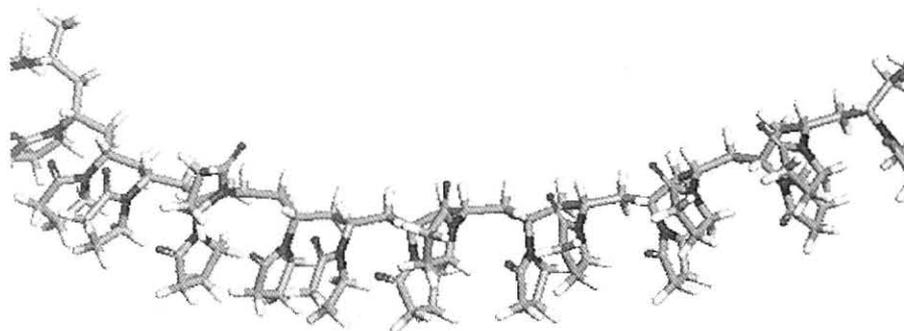
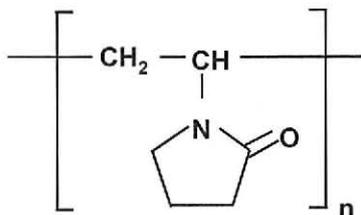


Fig.2-1 Chemical structure of polysulfone(PSf) and polyvinylpyrrolidone(PVP)

するために、認識、結合、解離など分子間の相互作用に関して完全なプロフィールをリアルタイムに得ることができる。

PVP 水溶液の濃度と PSf フィルムへの吸着量の関係調べた結果を Fig.2-2 に示した。この図から、水溶液濃度とともに吸着量が増大することが確認でき、PVP の吸着等温線は、通常の溶液吸着である、Freundlich 式と良く相関することがわかった (相関係数 0.98)。

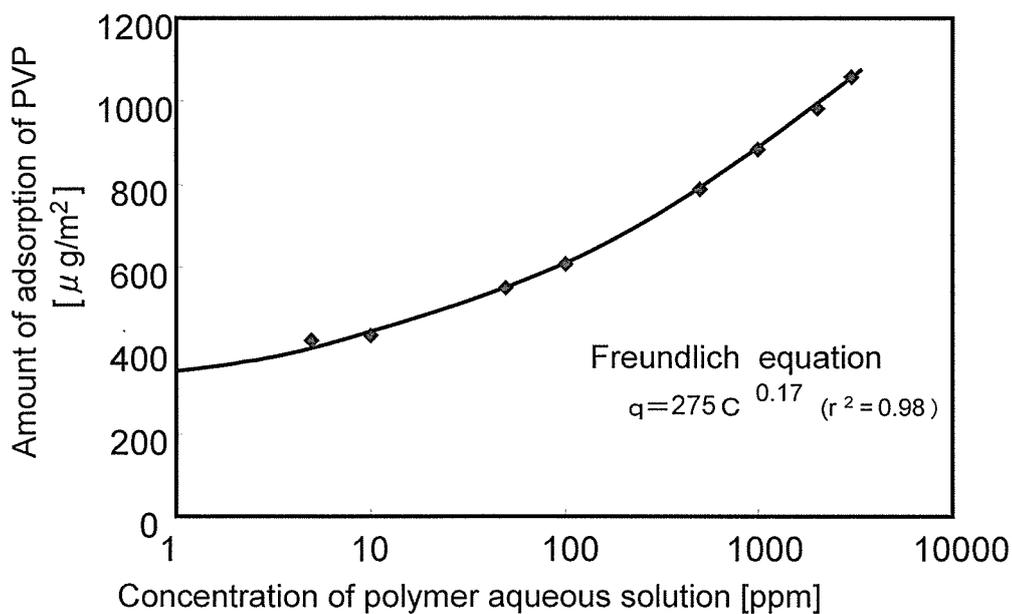


Fig.2-2 Adsorption of PVP on the PSf surface

この実験は、ポリマーの物理吸着特性を調べた実験であるので、表面の評価を行うためには、PVPを膜に固定化することが必要である。本研究では放射線を用いて発生するラジカルでのカップリング反応によってPVPを固定化させた。膜に固定化されているかどうかを、直接確認することは困難であるので、PSfへの固定化の確認はモデルフィルムでの洗浄性にて確認した。測定はSPRを用いて行った。

Fig.2-3には界面活性剤で洗浄した時のフィルム上のPVPポリマー量の変化を調べた結果を示した。PSfフィルムにPVPを吸着させたものは、界面活性剤の洗浄により、剥がれ落ちる。一方で、PVPを吸着後、 γ 線照射したものは、界面活性剤で洗浄しても吸着した量の90%程度は剥がれ落ちず、PSfフィルムに固定化していることが確認できた。

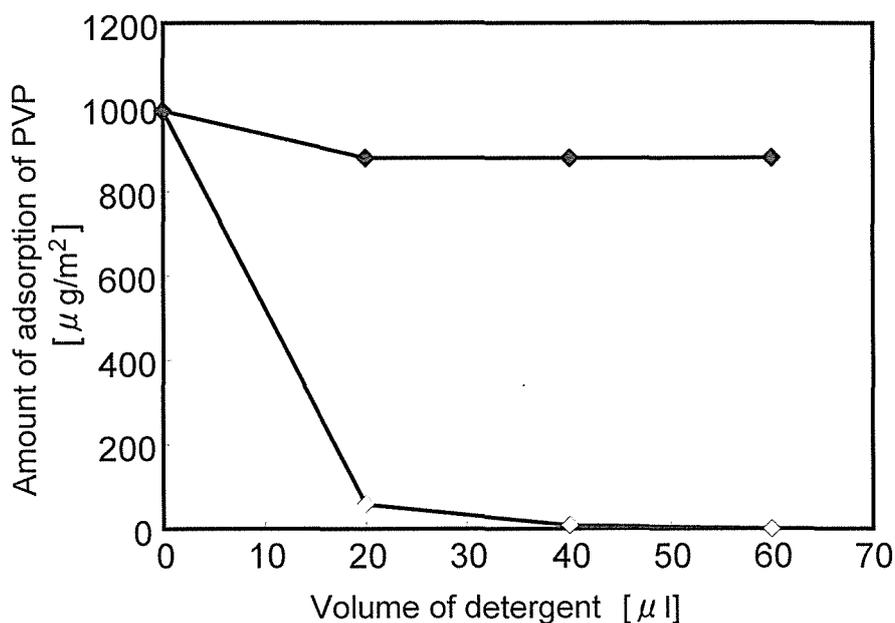


Fig.2-3 Immobilized of PVP on the PSf surface; (\blacklozenge) PVP immobilized, (\diamond) PVP adsorption.

2-3-2 PVPの生体成分付着抑制効果（血小板付着抑制）

PSf表面にPVPを固定化した中空糸サンプルを用いて血小板付着性評価を行った。横軸に膜に残存したポリマー量の推定値、縦軸に血小板付着数をプロットしたグラフをFig.2-4に示した。

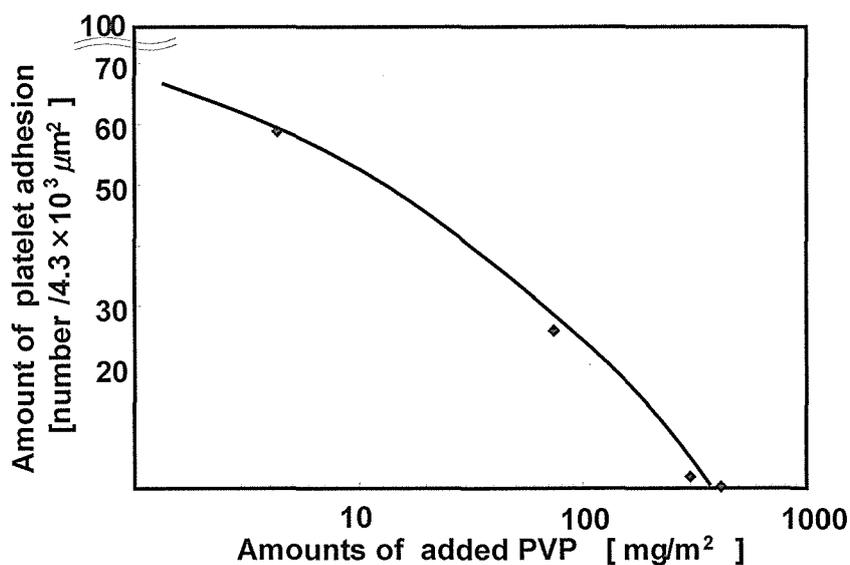


Fig. 2-4 Relationship between amounts of added PVP and adsorbed amounts of platelet

PVP が付与されるほど血小板付着抑制が認められ、 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 以上の表面量にて付着をほとんど無くすることができた。

2-3-3 PVP の水中での構造解析

PVP の血小板付着抑制効果を明らかにするために、PVP の表面構造について検討を行うことにした。一般に、ポリマーに水和する水としては、ポリマーと強く相互作用し、分子運動が束縛されるため、 -80°C でも凍らない不凍水、分子運動がやや低いため、 0°C 以下で凍る中間水、ポリマーと相互作用しないため、 0°C で凍るバルク水にわけることができる

(Fig. 2-5).

中間水や不凍水の量は、DSC や誘電緩和、IR、NMR などによって測定することができる。本実験においては、DSC および誘電緩和によって測定を行った。各水分率での PVP 水溶液の DSC 曲線を Fig.2-6(a)に示した。PVP 水溶液の水分率が低いときは、添加した水がすべて不凍水になるので、 -80°C まで冷却しても氷の融解ピークは認められない。さらに、水分量が多くなり、水分率 46%付近で、 -10°C 付近に中間水の融解ピークが認められた。さらに、水分を添加すると、 0°C で凍るバルク水の融解ピークが観測される。

添加した水分量、観測された水分量から、中間水、不凍水の量を求めることができる。PVP について、中間水、不凍水を DSC により定量し、水和に与える影響を検討した。この結果、PVP の繰り返し単位（分子量 111）あたりの中間水量は 2.8 個、不凍水量は 3.7 個と計算することができた。PVP の不凍水、中間水量の測定結果を Fig. 2-6(b)にまとめた。PVP

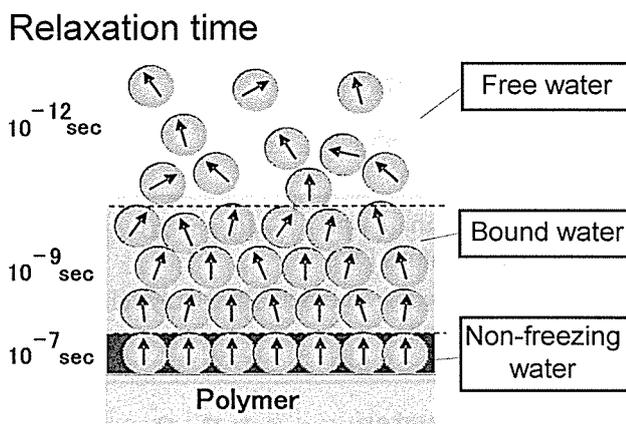
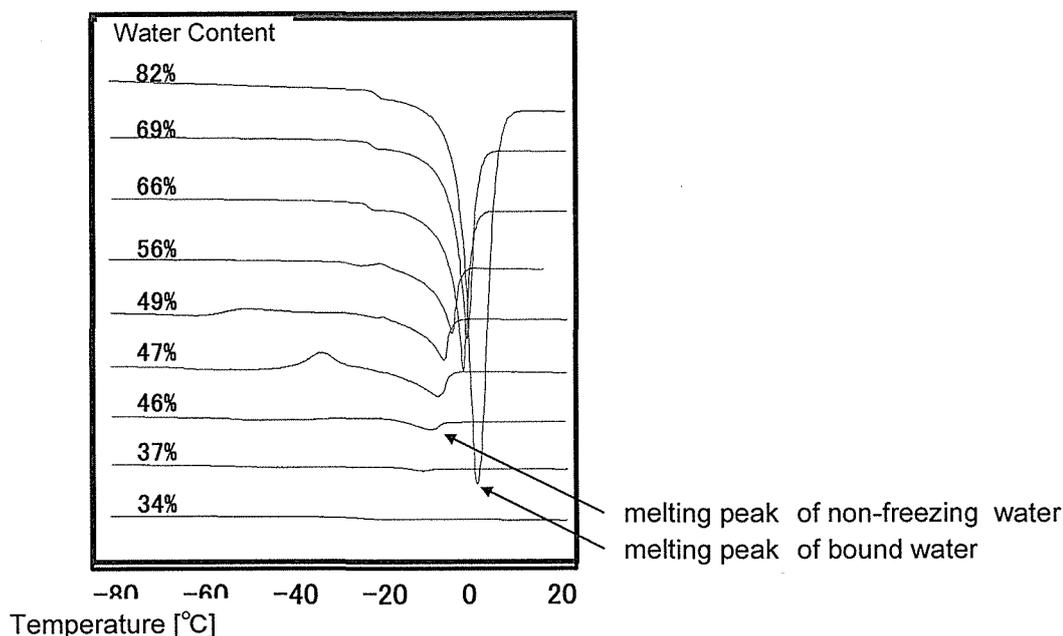


Fig.2-5 Schematic illustration of hydrated water on the material surface

(a) DSC curve of the PVP aqueous solution



(b) Number of water molecule per polymer repeating unit

Bound water	2. 8
Non-freezing water	3. 7

(c) Illustration of non-freezing water and bound water on polymer

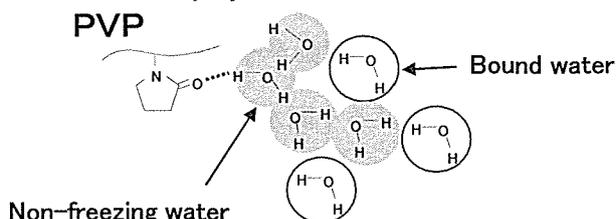


Fig.2-6 DSC curve of the PVP solution and schematic illustration of water on polymer

では中間水とほぼ同じ量の不凍水量が存在することがわかる。PVPでは、水との親和性が高いため、強く束縛する水の量も多いものと考えられた。また、誘電分散を用いた水の分析でも不凍水に相当する強い相互作用を有する水は、PVP 1 ユニットに対して、3.8 個と言う結果が得られており、2つの方法にて、水の状態を確認することができた。

中間水は不凍水より運動性が高いことから、中間水の入る隙間が多いということは、水中で膨潤した構造になっている可能性があるため、水中での分子半径を測定した。ここでは、溶液中のポリマーの分子半径を GPC-MALLS によって測定した。GPC-MALLS の結果を Fig.2-7 に示した。本方法を用いると、各分子量毎に、その半径を知ることができ、分子量約 100 万の PVP で 30nm 程度の広がりを持つと考えられることがわかった。

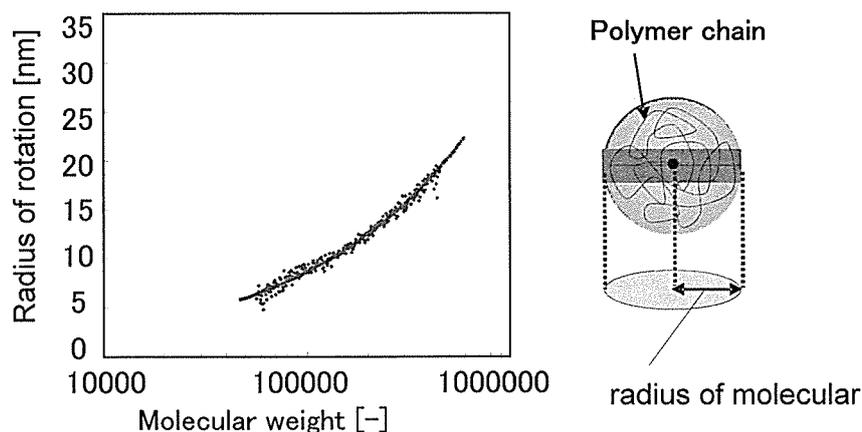


Fig. 2-7 Physical extention of PVP polymer in aqueous solution measured by GPC/MALLS

さらに、ポリマーの膨潤性が血小板付着に影響を与えているのではないかと考え、膨潤性が血小板付着に与える影響を調べた。ここでは、PVPの架橋フィルムを用いた。縦軸に血小板付着、横軸にフィルムの水分吸水時の膨潤比をとったグラフを **Fig.2-8** に示した。水分吸水時の膨潤比とは、乾燥時の重量に対する、吸収した水の重量の比を示しており、この値に比例して、架橋度が低く、膨潤性が高いと言える。PVPの架橋フィルムはPVP水溶液を板

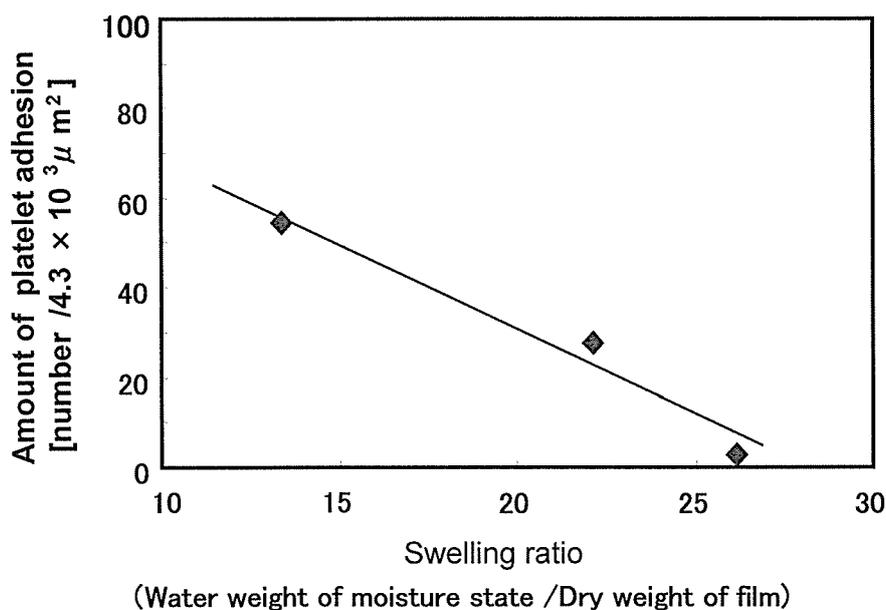


Fig.2-8 Relationship between swelling state of PVP film and amount of platelet adhesion

間に注入し、 γ 線照射線量を変えてゲル化させることで作製した。膨潤性が高いフィルムほど血小板の付着は抑制されており、この結果から、繰り返し単位の化学構造が同じであっても、膨潤性の高いフィルムは血小板が付着しにくいことが明らかとなった。

この結果を受けて、膜表面の膨潤性についての検証を行った。膜表面の膨潤層は、AFMフォースカーブ法によって求めた。AFMフォースカーブ法の概要を Fig.2-9 に示した。中空糸膜表面を AFM の探針が押し込んでいった際に、柔軟な膨潤層があった場合、この

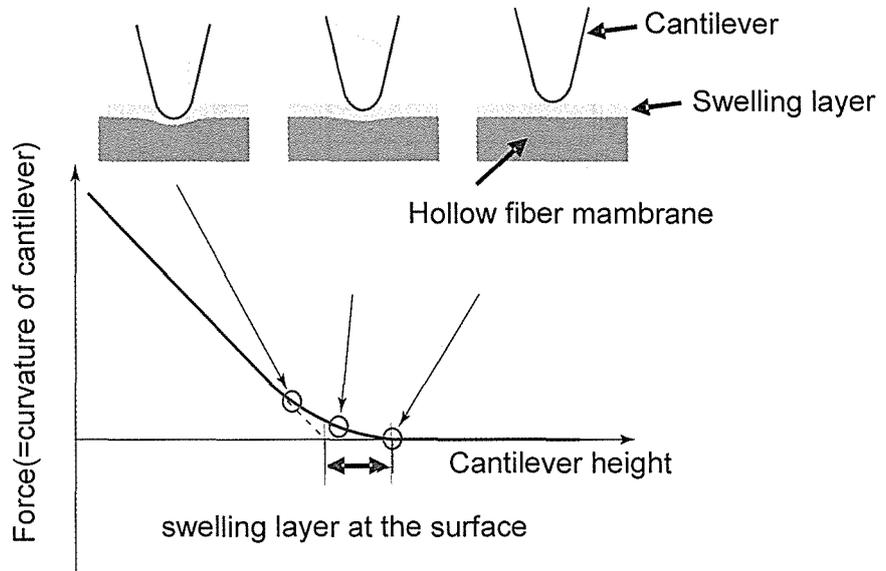


Fig.2-9 Analysis of hydrophilic region on the polymer surface by using force-curve method

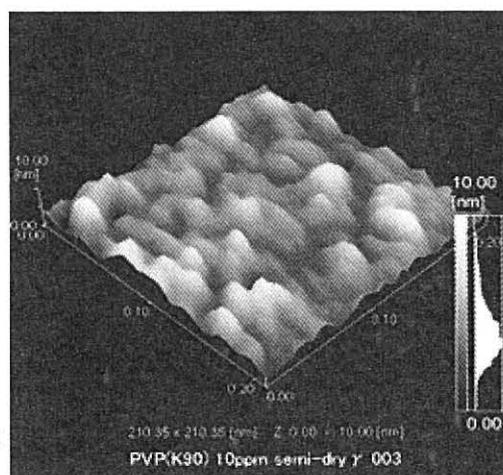
ような偏曲部が認められる。AFM の探針が中空糸膜に接触した点から、直線となった部分を外挿し x 軸との交点までの距離を、膜表面の膨潤層とした。

測定結果を、他の測定と合わせて、Fig.2-10 に示した。PSf 表面は平坦であるのに対して、PVP 表面に凹凸が見られる。凹凸のパターンは数 10nm であることから、GPC/MALLS の結果と併せて考えると一つの大きさが PVP 分子に相当する。また、AFM で測定された膨潤層は 7nm であり、この膨潤な表面の形成により、血小板付着を抑制していることが示唆された。

AFM image



100nm



Cross-section drawing



Swelling layer thickness(nm)

7

Fig. 2-10 Surface structure of PSf/PVP film

2-3-4 PVP 表面でのタンパク質付着抑制効果

PVP のタンパク質付着抑制効果を確認するために、5 種類のタンパク質 (Albumin, Lysozyme, CAB, Fibrinogen, α 1-ATP) の吸着量を SPR を用いて測定した。Fig.2-11 はその結果を示したものであるが、いずれのタンパク質においても飛躍的にタンパク質の

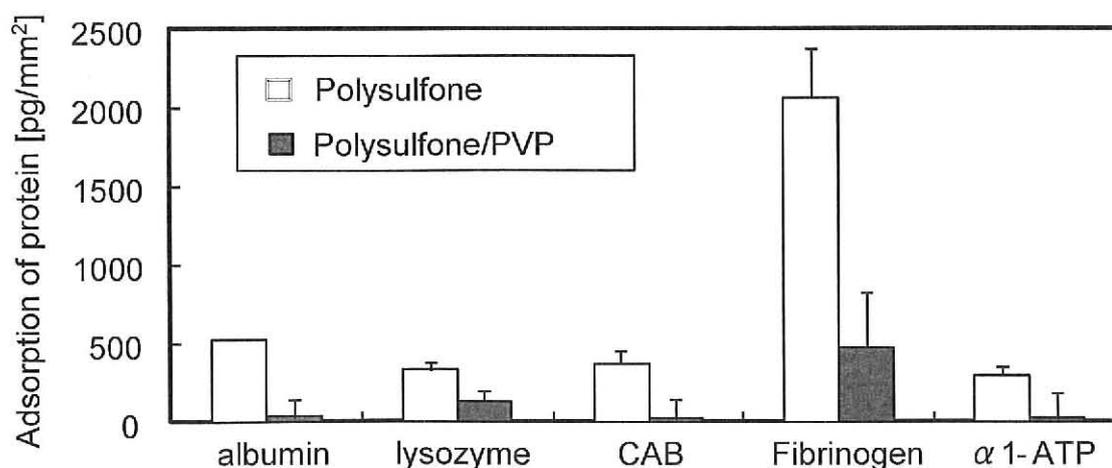


Fig. 2-11 Characteristics of protein adsorption by PSf ,PSf/PVP film

吸着が抑制されており、PVP が表面に存在することによって、タンパク質の抑制が可能であることを確認することができた。われわれは、これまでに表面に存在する PVP と接触角で示される親水性との関係、血小板付着との関係を PSf と PVP をブレンドしたモデルフィルムを用いて確認している (Fig.2-12, Fig2-13, 葉山ほか, 2004)。このときのブレンドフィルムでの検討結果においては、フィルム中の PVP 割合が 20wt% を超えると接触角が低くなり、血小板の付着も劇的に低下することがわかった。今回のサンプルでは、PVP が表面に覆われている状態であり、タンパク質吸着の結果もこれに対応した結果となっていると考えられる。

次に、実際の中空糸膜での各種タンパク質の吸着を調べることにした。Fig.2-14 には PSf/PVP 中空糸膜の内表面凹凸状態を AFM にて測定した結果を示しており、乾燥状態では凹凸が見られるものの、水中での観察では平坦な構造である。おそらく、水中で PVP が膨潤して、平坦化したものと推測される。Fig.2-15 には中空糸膜での各種タンパク質の吸着を調べた結果を示した。PSf/PVP 中空糸膜においてはほとんどのタンパク質で PMMA よりも吸着を抑制することができていることが確認できた。

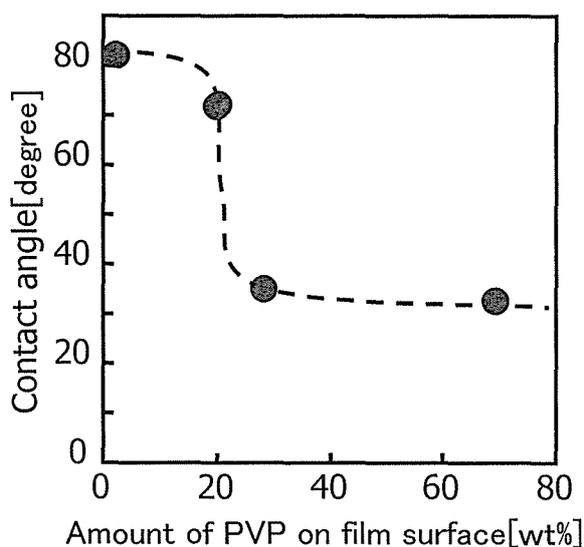


Fig 2-12 Relation between contact angle and amount of PVP present on film surface

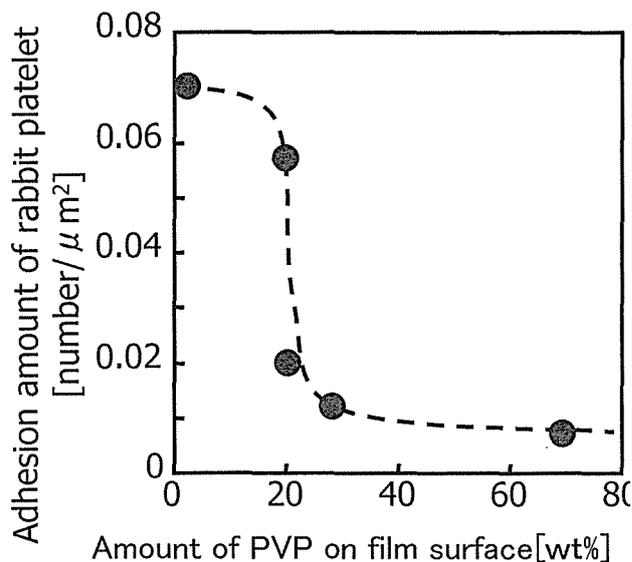


Fig 2-13 Relation between amount of rabbit platelet and amount of PVP present on film surface

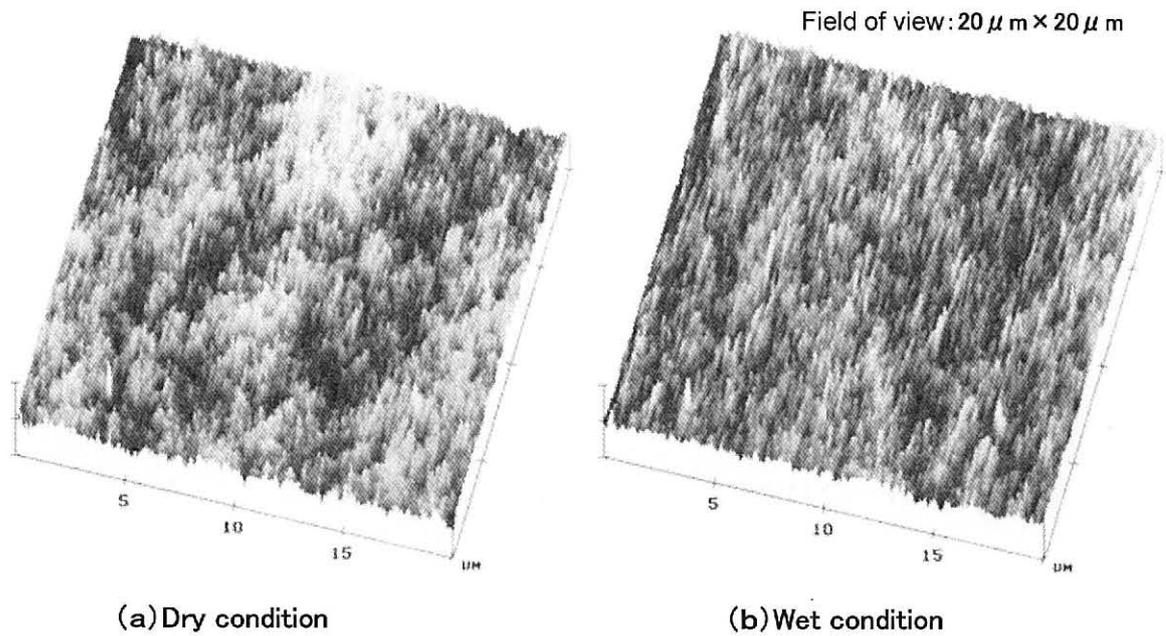


Fig.2-14 Surface structure of PSf/PVP hollow fiber membrane

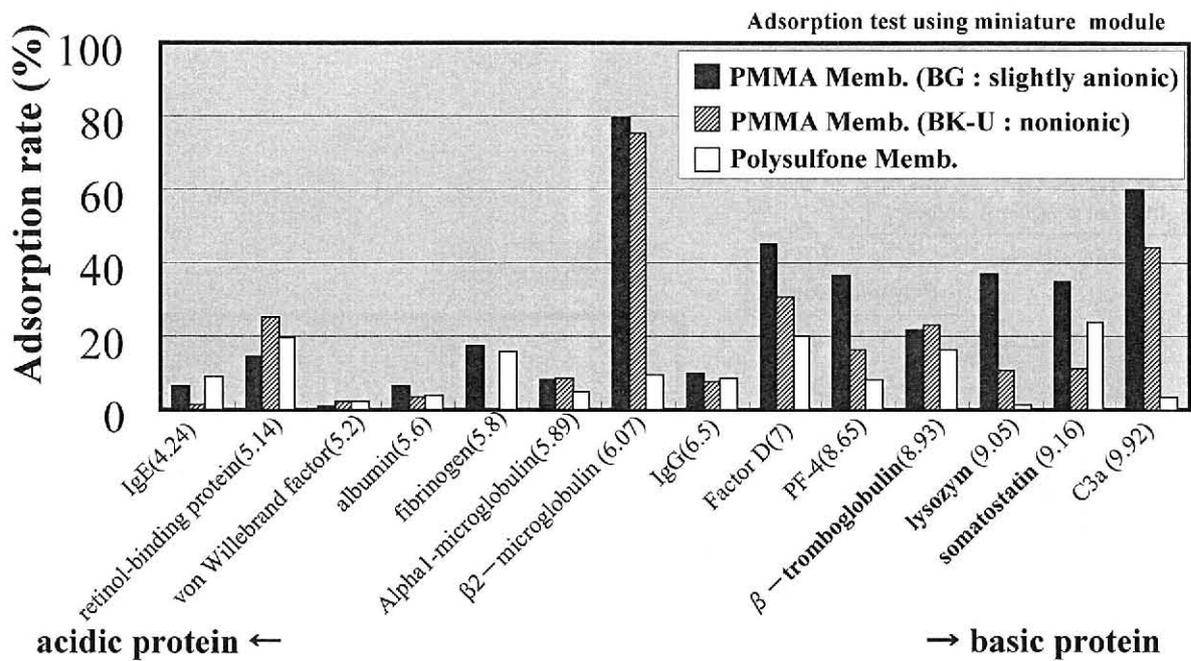


Fig. 2-15 Characteristics of protein adsorption by various hollow fiber membrane

2-3-5 リポソーム充填中空糸膜の基本物性

(1) リポソーム ローディング膜の基本特性

ポリスルホン膜(PS-膜)から成る中空糸膜モジュールへのリポソームの充填について検討した。ここでは、PSf/PVP 中空糸膜を用いた。中空糸膜は多孔体であり、この多孔質体を形成させる方法はいくつかあるが、透析膜では相分離法が用いられている(菅谷, 2006)。これは、ポリマーの均一な溶液を不均一な状態にして、ポリマーを含む相とポリマーが含まれない相(空孔になる部分)に相分離させる方法である。透析膜では、この相分離の大きさがナノレベルに制御されているために、高度なタンパク質のふるい分けを実現できた。この相分離を起こす手法には、熱により誘起される熱誘起相分離(Thermally-Induced-Phase-Separation: TIPS)法や、ポリマーの溶媒に対する溶解度特性を利用した非溶媒誘起相分離(Nonsolvent-Induced-Phase-Separation: NIPS)法などがあるが、PSf膜ではNIPSの原理で相分離を起こしている。NIPS法は高分子溶液を非溶媒中に浸漬することで相分離を起こす。製膜における相分離の形成は、非常に速く、1秒未満で主要な構造の形成が決定される場合も多いのでこれまで解析が困難であったが、最近では光散乱を用いて解析できるようになってきている(Shang et al., 2003)。

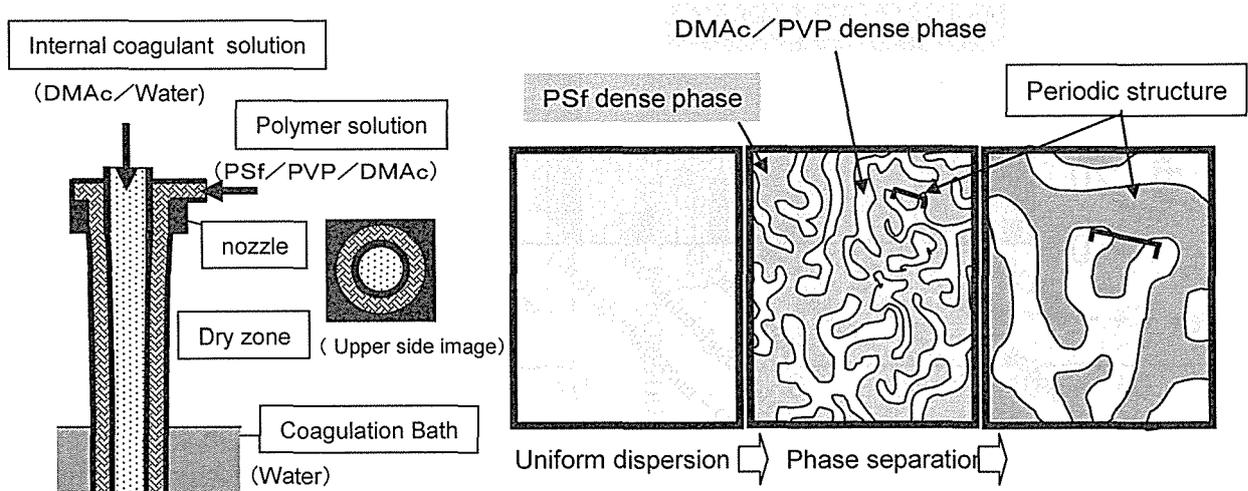


Fig. 2-16 Hollow fiber spinning apparatus and phase separation

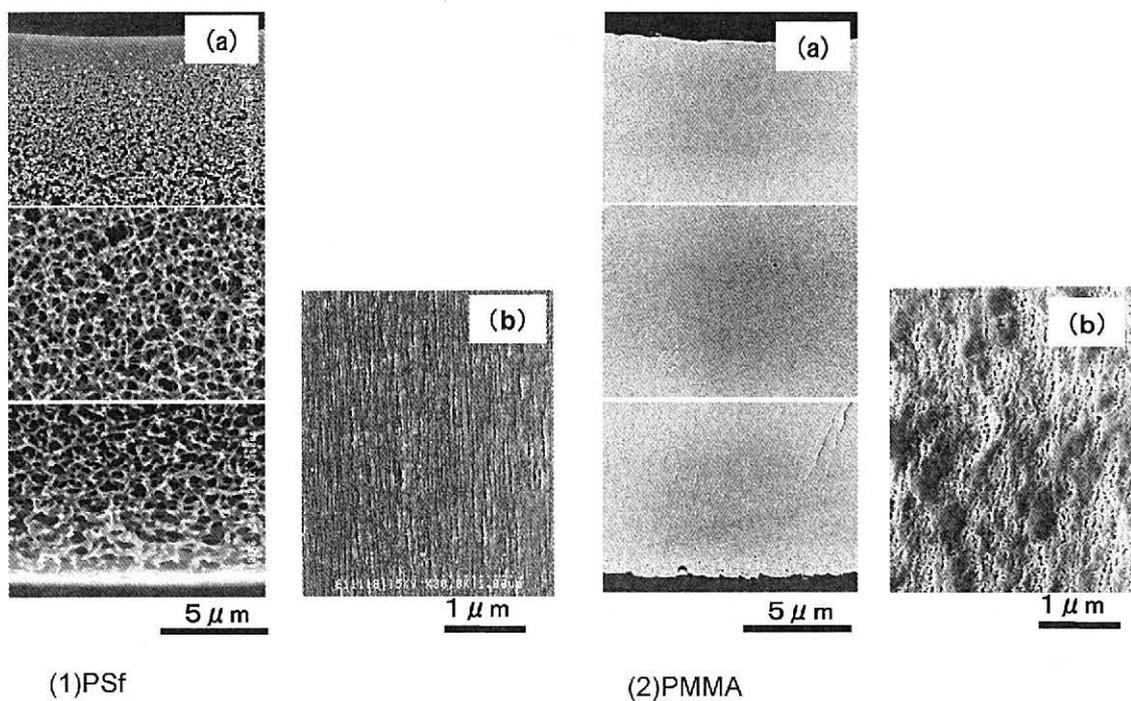


Fig. 2-17 Structure of hollow fiber membranes. (a) SEM observation of cross section (From the top; inner side, inner, outer side), (b) SEM observation of the inner membrane surface

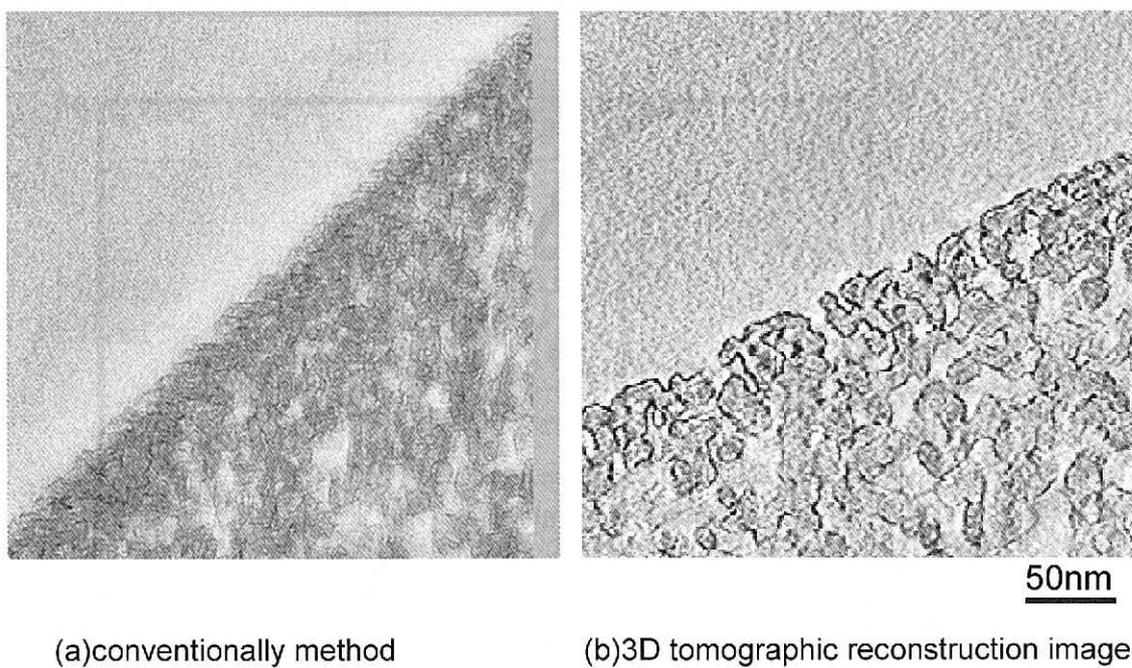


Fig. 2-18 Structure of inner surface in hollow fiber membranes observed by TEM

Fig. 2-16 に中空糸膜形成の模式図を示した。同心円状に配置された口金より、溶媒であるジメチルアセトアミド(DMAc)に溶かしたポリマー溶液が吐出され、その内側に非溶媒である水を含んだ凝固性の液体を流すことにより、両液の界面から相分離が進行する。その後、

凝固・水洗浴にて溶媒および親水性の PVP の大部分が洗い流されて中空糸膜が形成される。

ここでは PVP は、相分離を安定して形成させる造孔剤としての役割を有している。

Fig. 2-17 にはこの中空糸の膜構造を従来のポリメタクリル酸メチル (PMMA) に比較して示した。中空糸膜の内表面は緻密な構造を有しており、外表面側では大きな孔構造を有している。最内表面の構造は非常に緻密であり、透過型顕微鏡観察での超薄切片厚み以下の大きさであるがゆえに、その微細構造を正しく観察することは困難であった。しかしながら、透過型電子顕微鏡にて 3 次元観察と画像解析を行うことにより、超薄切片厚み以下のナノ構造の観察が可能となった。Fig. 2-18 はその観察結果であり、最内層には約 10nm の孔が開いていることを直接観察することができている (菅谷他, 2006)。この内表面の構造からも、相分離は PSf 濃厚相と DMAc/PVP 濃厚相に分かれて成長していくものと考えられる。

Fig. 2-19 は膜の分離特性を示している。PMMA 膜よりもシャープな分画能を示しており、このような構造を持つ特徴を示している。

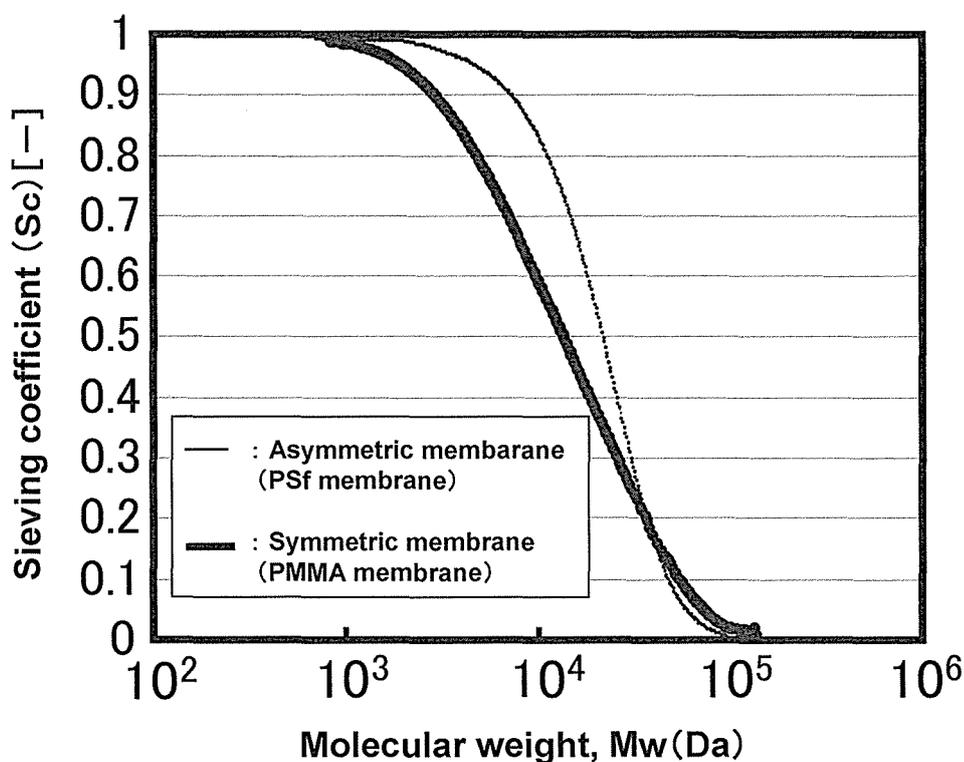


Fig. 2-19 Separation properties of hollow fiber membranes

膜の設計コンセプトを Fig.2-20 に、膜のモジュールの実験装置を Fig.2-21(a)に示す。リザーバーの POPC リポソーム(30nm)の溶液を、100 本の中空糸膜からなるモジュールに充填した。そして、濾過溶液は、リザーバー溶液に再循環した。供給側およびパーージ側溶液の流速は 9:1 に設定した。リポソーム溶液の典型的なクリアランスを Fig.2-21(b)を示す。1.0ml/min の流速では、ほとんどすべてのリポソームが膜のモジュールに充填されることがわかった。以上の知見は、多孔性の PSf 膜の中に 30nm のリポソームが集積し、充填された事を示している。

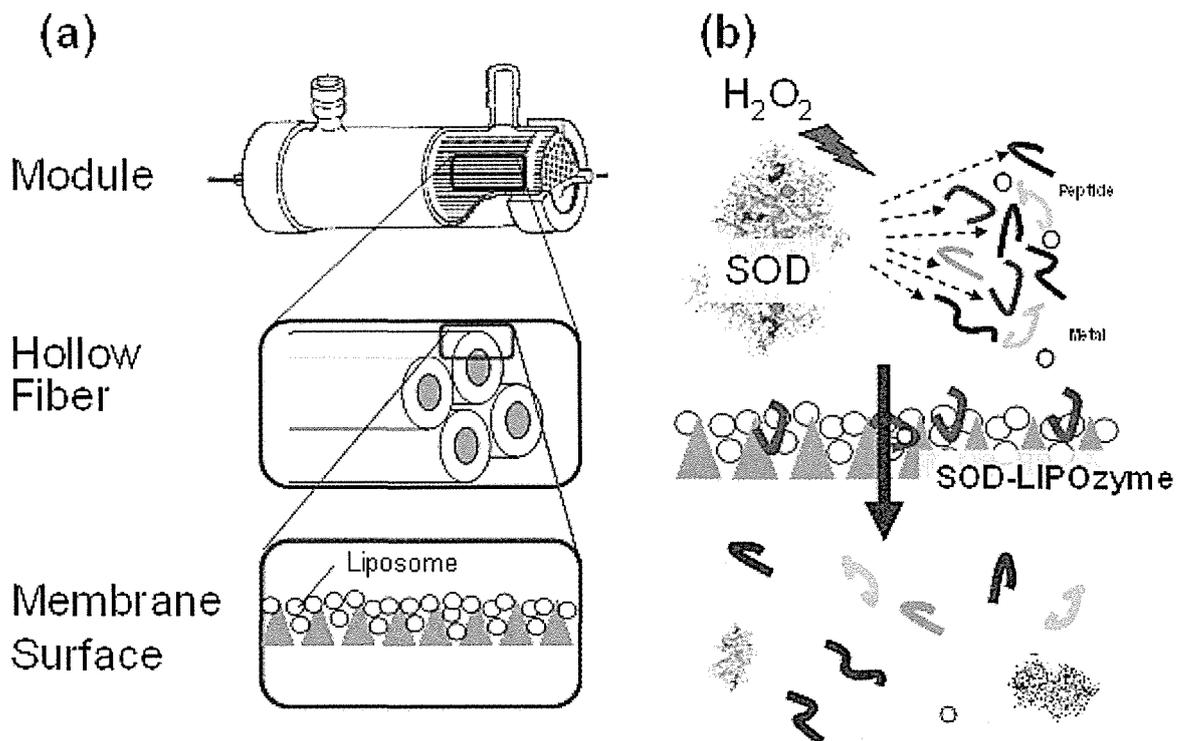


Fig.2-20 Conceptual Illustration of (a) Hollow Fiber Liposome Loaded Membrane (LLM) and (b) SOD Fragment Separation Using LLM for Preparation of SOD LIPOzyme-Module

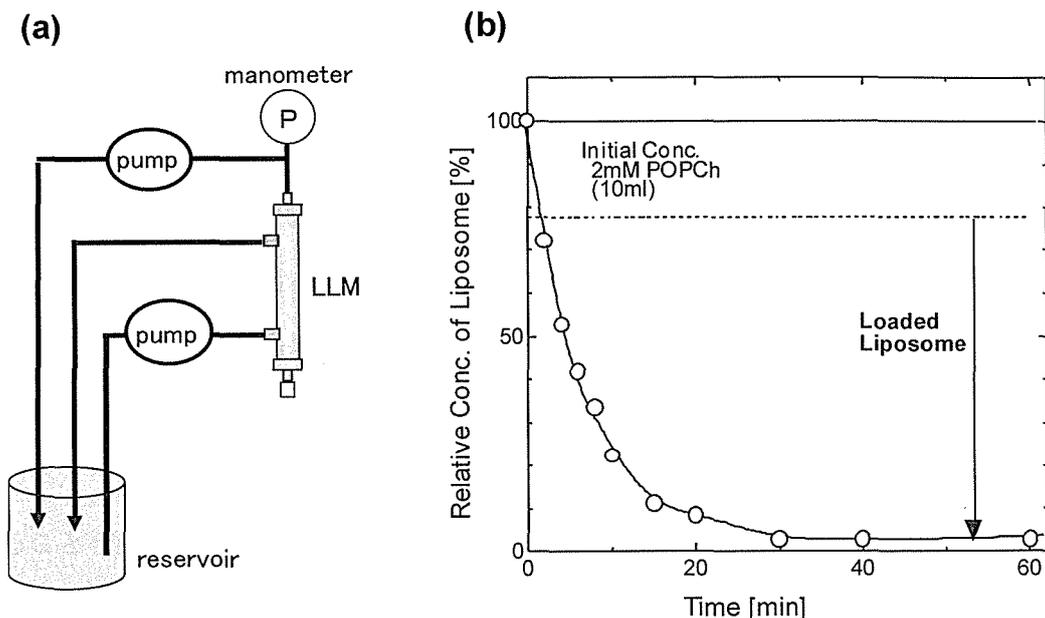


Fig.2-21 Experimental Setup for Liposome Loading (a) and Typical Clearance Behavior of Liposome Solution (b)

(2) 濾過特性

各種流速条件において、リポソーム充填後の膜のモジュールの濾過特性を検討した。

Fig.2-22は、単位面積あたりの限外濾過速度(UFRS)に及ぼすリポソーム充填量の影響を示している。リポソーム充填量の増加に伴い、UFRS値は元の値の60%まで減少するものの、使用に耐えられない顕著な減少は観測されなかった。Fig.2-23に示すように、異なった流速におけるUFRS値を解析した。本実験範囲では、リポソームを充てんしていないコントロールモジュールにおいては顕著な減少は見られなかった。POPCリポソームが膜モジュールに充填された場合も同様の傾向を示したが、UFRS値はコントロール膜のモジュールのおよそ50%まで減少した。ただし、特に膜の経時的な目詰まりは観測されず安定しており、リポソームが充填されて緻密化した分だけ低下したのと考えられ、実用上は問題ない。

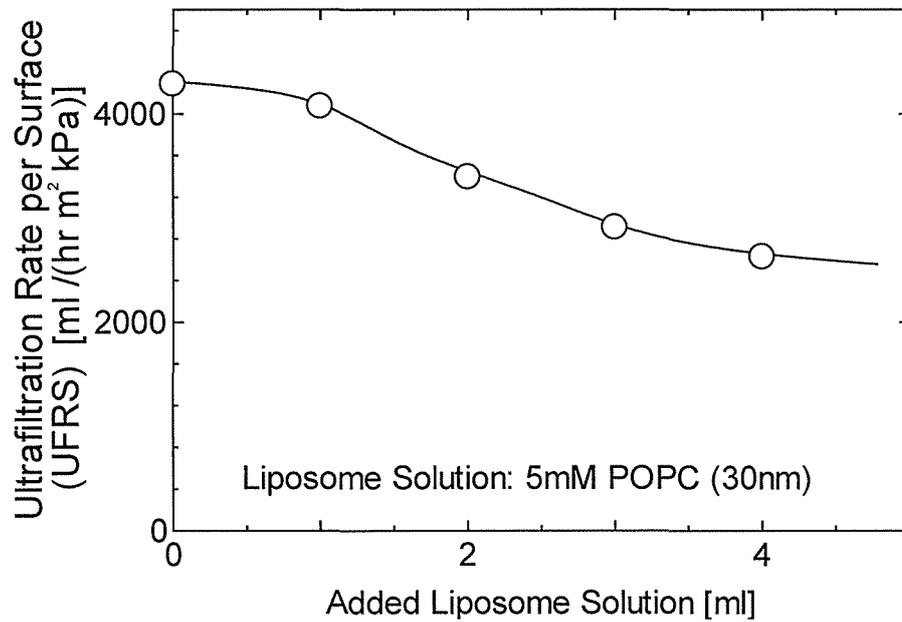


Fig.2-22 Effect of Loaded Amounts of POPC Liposome on the Flow Rate of Water in Hollow Fiber Membrane Module

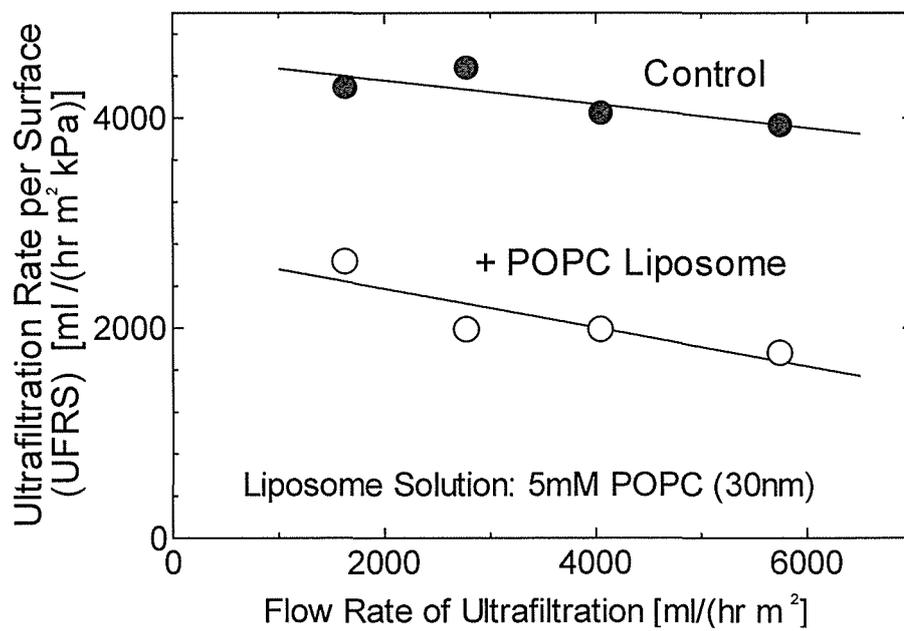


Fig.2-23 Filtration Property of Hollow Fiber Membrane Module and Liposome Loaded Membrane Module

(3) POPCリポソームの漏出

リザーバーと膜のモジュールシステム出口における、POPC濃度を測定した。Fig.2-24は低い圧力の下でのリザーバー(Open Key)のPOPC濃度レベルを示している。0.78kPa未満の低い圧力では、80%以上のPOPCリポソームが膜のモジュールに充填された。しかし流速(圧力)の増加に伴って、充填されたリポソームは減少し、POPC濃度の割合が、充填POPCの初期濃度の60%まで低下した。0.8kPaより高い圧力範囲では、膜のモジュールの出口から、POPCの漏出が観測された。また、より高い流速で、より高い圧力範囲(強濾過実験)条件下で、濾過特性を検討した。流速の増加に伴って、リザーバーのPOPC濃度は高くなるものの、濾過側の漏れたPOPCが明確に観測されした(充填POPCの10%の漏出)。

流速の減少は、より高い圧力条件下で、PS膜のモジュールの小さい空間にリポソームが充填され、リポソームの分裂・破壊の可能性が考えられる。しかしながら、膜のモジュールの

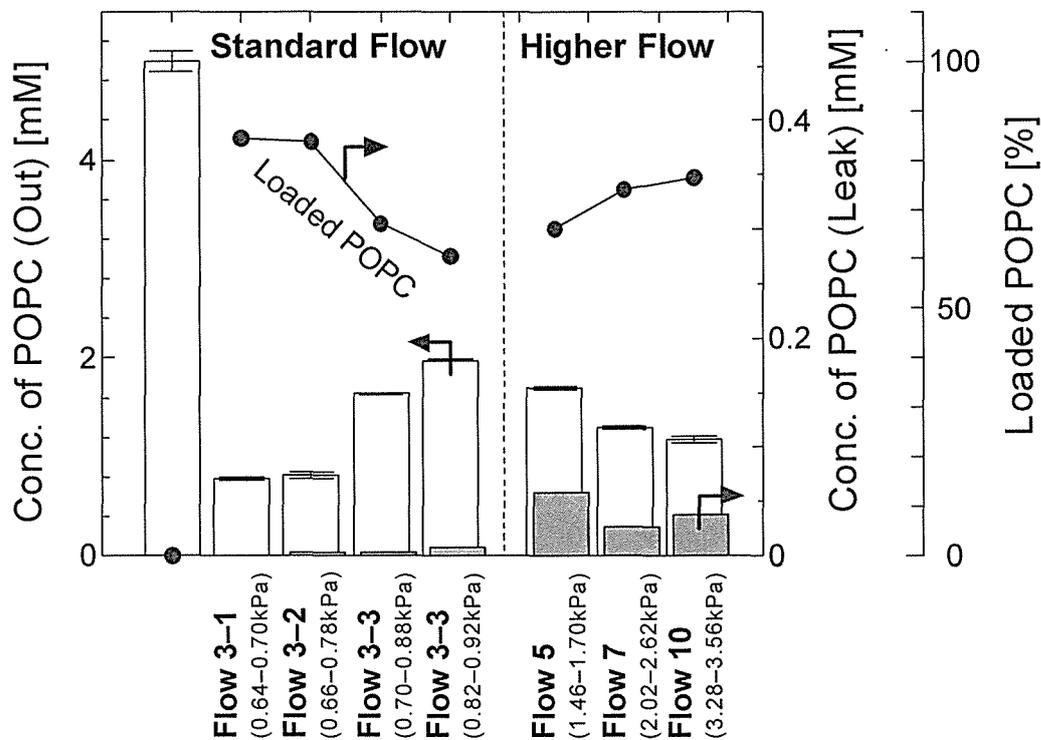


Fig.2-24 Leakage of Phospholipid from HF-LLM at Different Pressure Flow Rates and Pressures. Liposome: POPC Liposome, 30nm

圧力がいったん標準圧に解放されると、上の濾過の特性は可逆的に回復する事がわかった。

上記の知見は、充填リポソームは、高圧条件下で破壊されないものの、血液サイド膜の狭い水路から漏出する可能性を示唆している。 以上のように、膜のモジュールの濾過特性に大きな影響なく、PS膜の中空糸膜モジュールに、30nm以上のリポソームを充填できる事が示された。

2-3-6 リポソーム充填膜モジュールを用いた酸化・断片化SODの回収

これまでに、SODが過酸化水素により、酸化・断片化される事が報告されている(Tuan et al., 2008a,b,c). 断片化しているSODは、近年、リポソーム自体が有する分子認識機能により、共存する金属イオンと共に、静

電的・疎水性相互作用、ならび

に、水素結合を通じて、リポソーム表層に提示され、元の

SODのような機能 (SOD

LIPozyme機能 : (superoxide → hydrogen peroxide)を誘導される事が報告されている].

中空糸膜モジュールに充填さ

れたリポソームは、SOD酸化・断片化ペプチド混合物から、

特定のSODの断片を認識分離

できると期待される。SOD断

片溶液は最適の流速でLLMに

導入した。すべての濾過モー

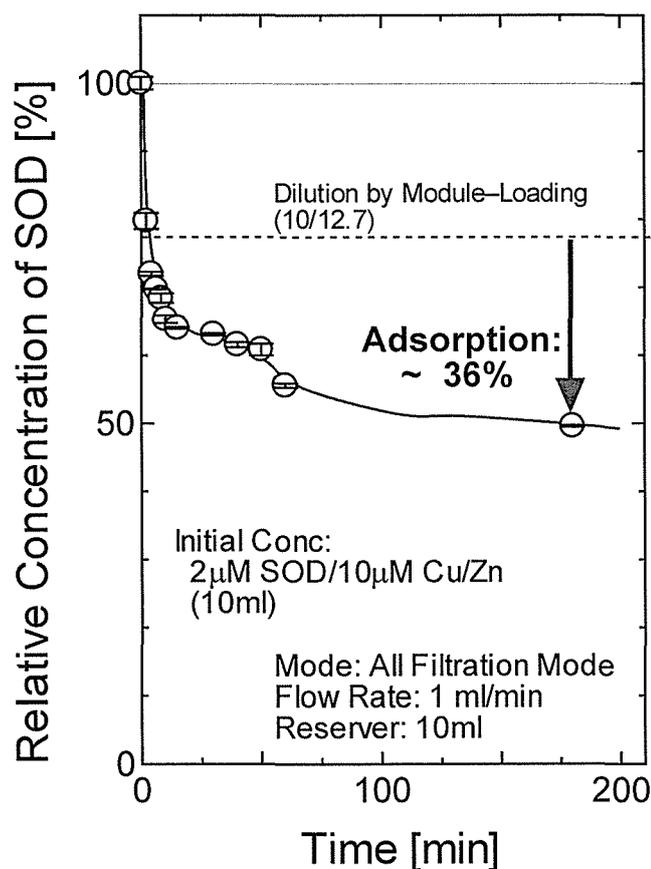


Fig.2-25 Adsorption of Fragmented SOD Using Liposome-Loaded Hollow Fiber Module

ドにおいて90%の濾過(10%は外側を循環)を行う条件にて実施した。SOD(2 μ M)を2mM過酸化水素で12時間処理し、Fig.2-21に示すように、10 μ M Cu, およびZnイオンとともに、LLMモジュールに導入した。その後、リザーバーのSOD断片濃度の経時変化を測定した。

典型的なSOD吸着挙動をFig.2-25に示す。時間の経過に伴って、SOD濃度レベルは徐々に減少し、飽和値を示した。サンプル希釈による仮想的な濃度と、最終的なSOD濃度の差が、

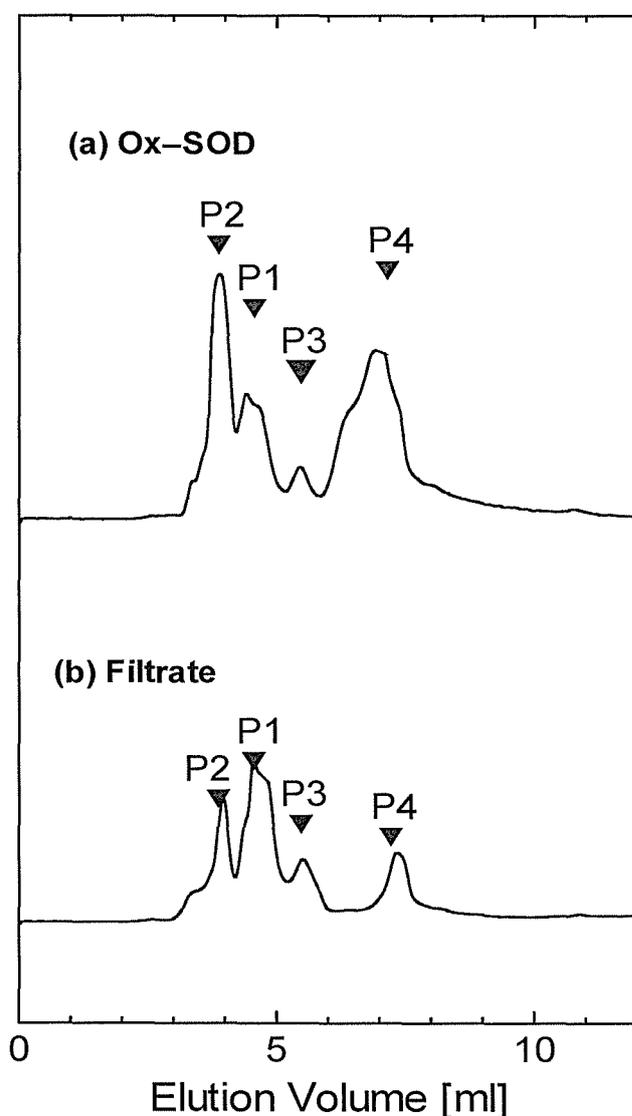


Fig.2-26 RP-HPLC Chromatogram of SOD Fragment Solution after Its Circulation in LLM

SOD断片が中空糸膜モジュールに充填されたリポソームに吸着した量に相当する。リポソームはすべてのSOD断片の10%を吸着する事がわかった。

さらに、RP-HPLCを用いて、吸着したSOD断片の特性を解析した。Fig.2-26は、酸化SOD溶液のクロマトグラムと、LLMを用いてろ過したSOD断片溶液のクロマトグラムを示している。酸化SODの場合、4種類のピークが観測され、既報と一致した。また、LLM処理後のクロマトグラムには差が見られた。ネイティブのSODに相当するP1断片では、大きな変化が見られないものの、P4断片においてピーク面積の減少が観測された。酸化して断片化しているSODのクロマトグラムは以前に報告されており、限外ろ過ならびにRP-HPLC解析によって、溶出時間の長い画分に含まれる特定断片が、リポソームと相互作用することも報告されている。今回の結果はこれらの過去の知見とも一致している。両性イオンから成る各種リポソ

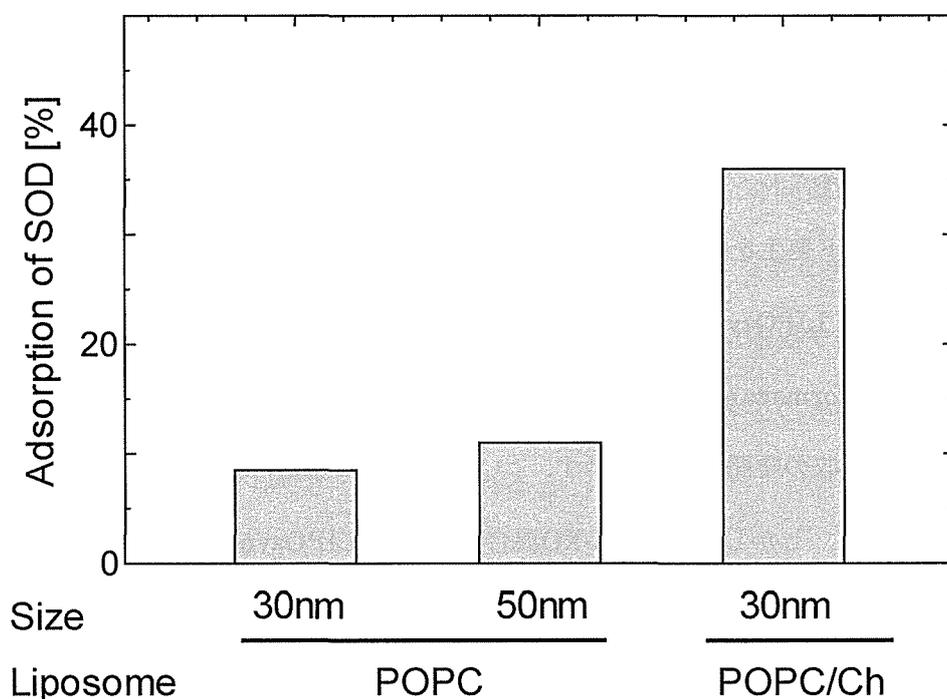


Fig.2-27 Comparison of Percentage of Adsorption of Oxidized and Fragmented SOD in LLM

ームにおける、SOD断片の吸着結果を、Fig.2-27にまとめた。POPC/Chリポソームの場合で最も高い値が得られた。SOD断片の吸着へのリポソーム種類の効果は、これまで報告されている。そこでは、POPC/ChリポソームがSODペプチド断片の水素結合を安定させるために吸着が増加する事が報告されている。LLMの上のSOD断片の吸着に関する上記の結果は、バッチ系で解析したこれまでの知見とも一致している。以上のように、SOD断片が膜モジュールに充填されたリポソームに吸着分離可能であることが示された。この結果は、LLMを用いて、SOD断片化ペプチドからSOD LIPOzyme調整可能であることを示している。

(5) 中空糸膜モジュール充填型SOD LIPOzyme

SOD LIPOzymeを調製・充填したLLMの、SOD様活性を検討した。リポソーム充填とSOD断片吸着の後に、SOD活性を測定した。キサンチン(X)とキサンチン酸化酵素(XO)混合物は、Superoxide発生の実験システムとして知られている(Fig.2-28(a))。WSTを指示薬として、そのFormazanへの変化から、Superoxideの定量が可能である。近年では、中空糸膜のSuperoxideの生成ならびに膜透過を検討するために、キサンチンとキサンチン酸化酵素をSuperoxide生産系としての利用が報告されている。前報で使われた上の方法論に基づいて、スーパーオキシド発生を抑制するSOD様活性を測定した(Fig.2-28(b))。X/XO混合物を調製した直後、SOD LIPOzymeを充填したLLMに導入した。循環はX/XO混合物で行い、WSTから変換されたformazan由来の吸収を経時的に測定した。Fig. 2-28(c)にはリザーバー溶液における、UV吸収の時間的経過を示す。コントロールの場合では、時間に従って、formazanの量は増加した。しかしながら、X/XO混合物がSOD LIPOzymeと共にLLMモジュールに適用されたときでもformazanは増加しなかった。コントロール中空糸膜へのX/XO混合物の処理自体が「過酸化物」(データ省略)の抑制を示さなかったためと考えられる。

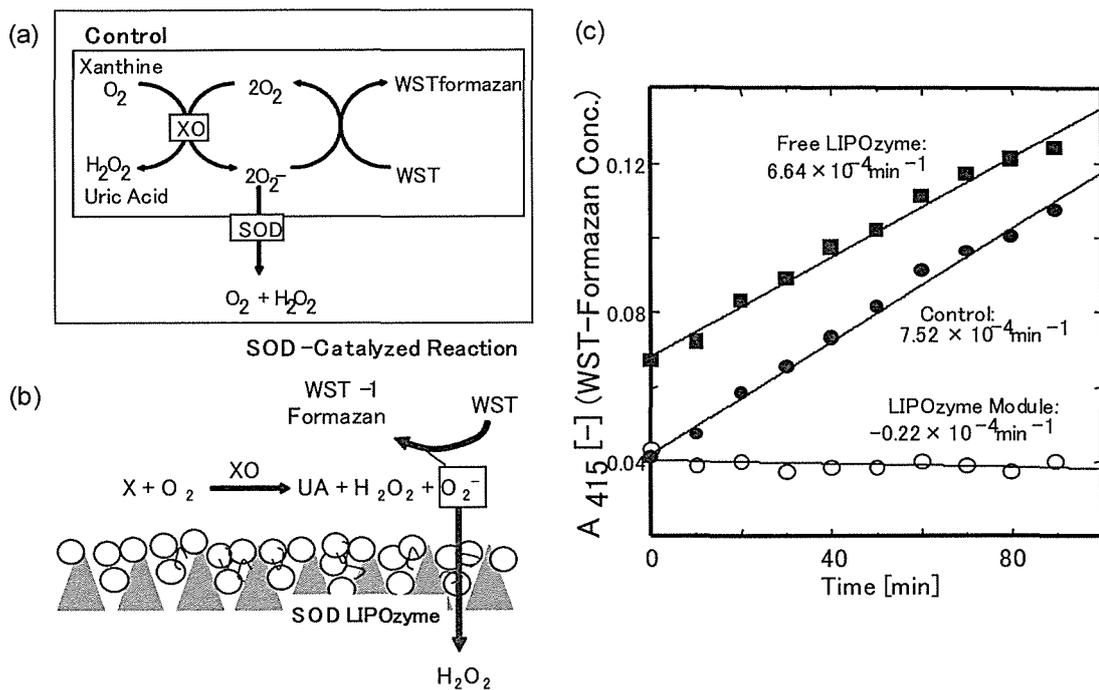


Fig.2-28 Evaluation of SOD-Like Activity of SOD LIPOzyme

ビタミンE修飾した透析膜が、液透析膜のモジュールを設計に利用可能である事が報告されている。近年では、臨床的な検討から、ビタミンE修飾膜で酸化ストレスを低減した例も報告されている。しかしながら、(i) ビタミンEの酸化ストレス抑制効果が低い、(ii)触媒反応ではないので、持続性/安定性が低いなどの問題が考えられる。今回得られた知見は、中空糸膜モジュールに充填されたリポソームが、SOD様機能を誘導する事を示している。今回の結果は、SOD LIPOzymeが、ROSの除去を目的とした血液透析に適用できる可能性を示唆している。リポソーム膜ならびに環境ストレス条件を適切に選択することにより、より安定性の高いLIPOzyme機能を付与できると期待される。

2-3-7 正濾過係数・逆濾過係数の算出

(1) 正濾過係数・逆濾過係数

Fig. 2-29 は濾過流量と膜間圧力差(TMP)の関係を示したものである。トータルの濾過として血液側から、透析液側に濾過をかけている範囲(濾過流量が 0~50ml/min)と、透析液側から血液側に濾過をかけている範囲(濾過流量が-100~0ml/min)では濾過流量と TMP の関係を示す傾きは異なっている。これは、正濾過が支配的に起こる状態と逆濾過が支配的に起こる状態の違いである。Table 2-1 は Fig. 2-29 のデータから Eq. (1)~Eq. (4) を用いて求めた正濾過係数と逆濾過係数である。正濾過係数は機能分類法の濾過実験で求めた値とほぼ同じであるが、逆濾過係数については、水系の透過係数の約 1/3 となっている。これは、膜表面に付着しているタンパク層の影響を受けたものと考えられる。

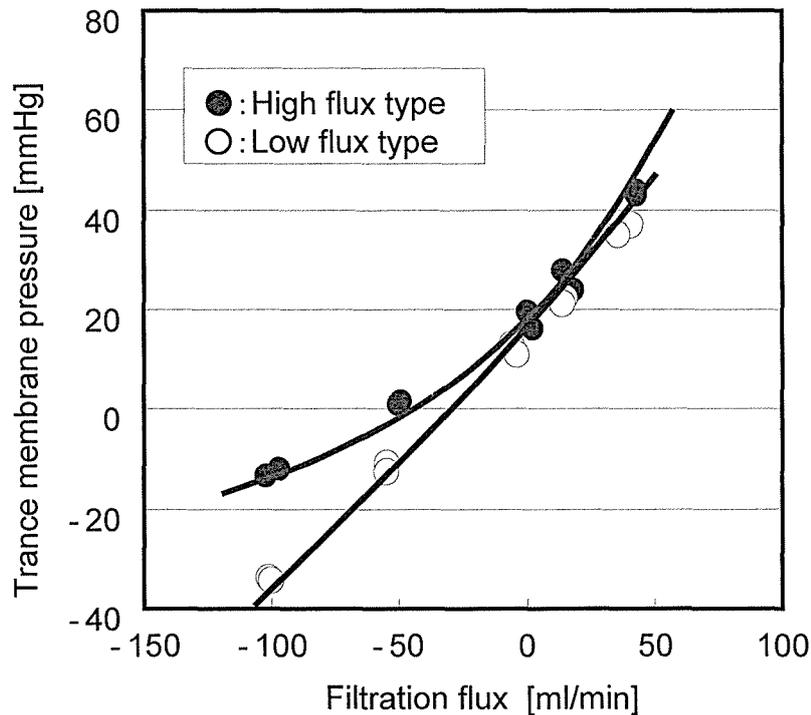


Fig.2-29 Relationship between total filtration flow and transmembrane pressure

Table2-1 Filtration Coefficient and Reverse Filtration Coefficient

	Filtration Coefficient Lp_B [ml/m ² · hr · mmHg]	Reverse Filtration Coefficient Lp_D [ml/m ² · hr · mmHg]	Filtration Coefficient (Bovine blood) [ml/m ² · hr · mmHg]	Filtration Coefficient (Water) [ml/m ² · hr · mmHg]
High flux type	55	233	55	700
Low flux type	55	100	55	300

(2) 理論計算モデル

Fig. 2-30 は中空糸膜の有効長と β_2 -microglobulin クリアランスの関係を示したものである。実線は長さ25cm のクリアランス実測データと Fig. 2-29 の実験で得た濾過係数をもとに理論計算を行った計算値である。計算では中空糸有効長と共にクリアランスの増加を示しており、実測点もこの計算結果に近い結果である。

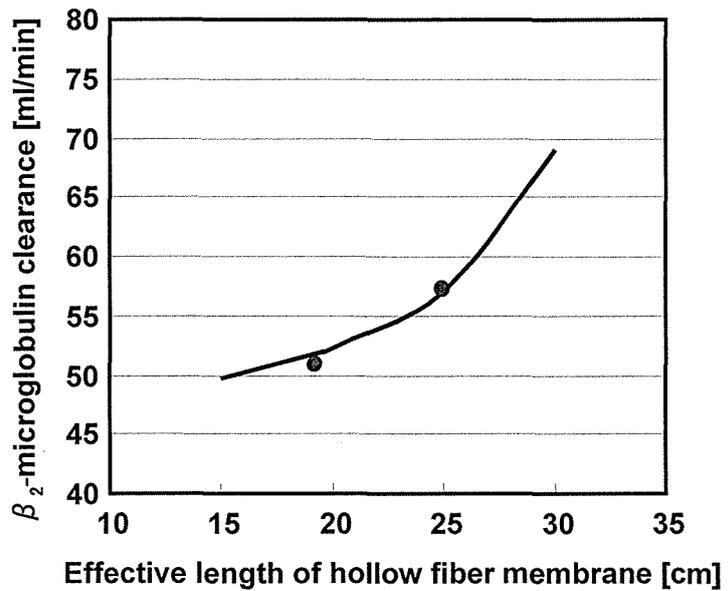


Fig.2-30 Effect of effective length of hollow fiber on the clearance of β_2 -microglobulin and its theoretical calculation. Circles are measured value (reference point) and line is calculated value. Condition for calculation: Effective Area of Membrane=1.6m², inner diameter of hollow fiber=200 μ m, membrane thickness=40 μ m, hollow fiber filling rate(=Total cross-section area of hollow fiber membrane/ cross-section area of a module) =52%, filtration coefficient of bovine blood=55 ml/m³/hr/mmHg, reverse filtration coefficient of bovine blood=233 ml/m³/hr/mmHg, Qf=16ml/min

2-3-8 各種形状・膜パラメーターと性能向上

(1) 各種形状パラメーターと性能向上

Fig.2-31 はダイアライザーの性能を向上させる一般的なパラメータに関する理論計算結果を示したものである。ポリスルホン膜は内表面のみに緻密な機能層を持っている非対称構造の膜であるため、中空糸膜厚の影響は小さい。中空糸内径と、糸束の充填密度はこれまでの報告同様に、変えることによって性能を高くすることができる。

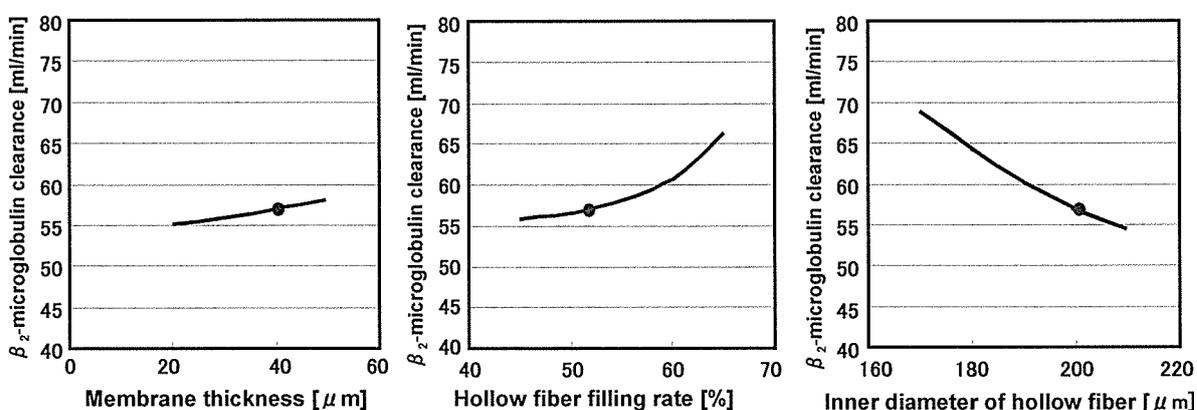


Fig.2-31 Effect of morphological parameters on the clearance of β_2 -microglobulin. Circles are measured value (reference point) and line is calculated value. Condition for calculation in common: Effective Area of Membrane=1.6m², inner diameter of hollow fiber=200m, Effective length of hollow fiber membrane =25cm, membrane thickness=40 μ m, hollow fiber filling rate =52%, filtration coefficient of bovine blood=55 ml/m³/hr/mmHg, reverse filtration coefficient of bovine blood=233 ml/m³/hr/mmHg, Qf=16ml/min

(2) 膜性能パラメーターと性能向上

Fig.2-32 は逆濾過係数と β_2 -microglobulin クリアランスの理論計算結果である。濾過係数が高い方が性能を高くできることは知られているが、逆濾過係数も高い方が、結果的には内部濾過量を多くすることができるために、性能を高くすることが期待できる。

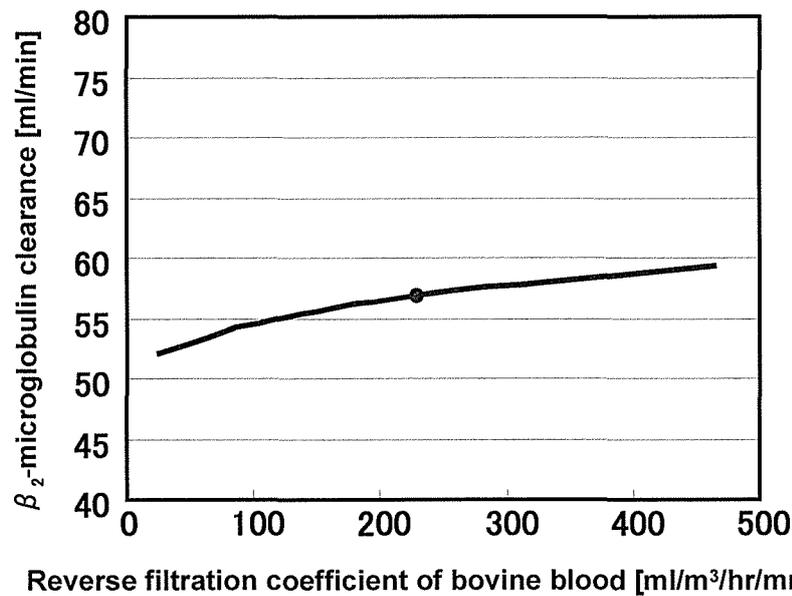


Fig.2-32 Effect of reverse filtration coefficient on clearance of β_2 -microglobulin. Circles are measured value (reference point) and line is calculated value. Condition for calculation : Effective Area of Membrane=1.6m², inner diameter of hollow fiber=200 μ m, Effective length of hollow fiber membrane =25cm,membrane thickness=40 μ m, hollow fiber filling rate =52%, filtration coefficient of bovine blood=55 ml/m³/hr/mmHg, Qf=16ml/min

2-3-9 内部濾過促進型ダイアライザーの設計と性能確認

(1) 内部濾過促進型ダイアライザーの可能性

最後に、理想的かつ現実的なデザインについて計算を行った。Fig. 2-33 は Fig. 2-30～Fig. 2-32 での計算範囲に対して、計算から得られる内部濾過量と β_2 -microglobulin クリアランスの理論計算結果を表したものである。膜厚以外は各計算共にほぼ、内部濾過量と共に性能の向上がみられる。ただし、各改良を単独で行っただけでは大きな効果は期待できない。そこで、これらの項目を、大きな無理が生じない範囲で組み合わせて計算を行った結果（図中の点）、大幅な性能向上が期待できることがわかった。

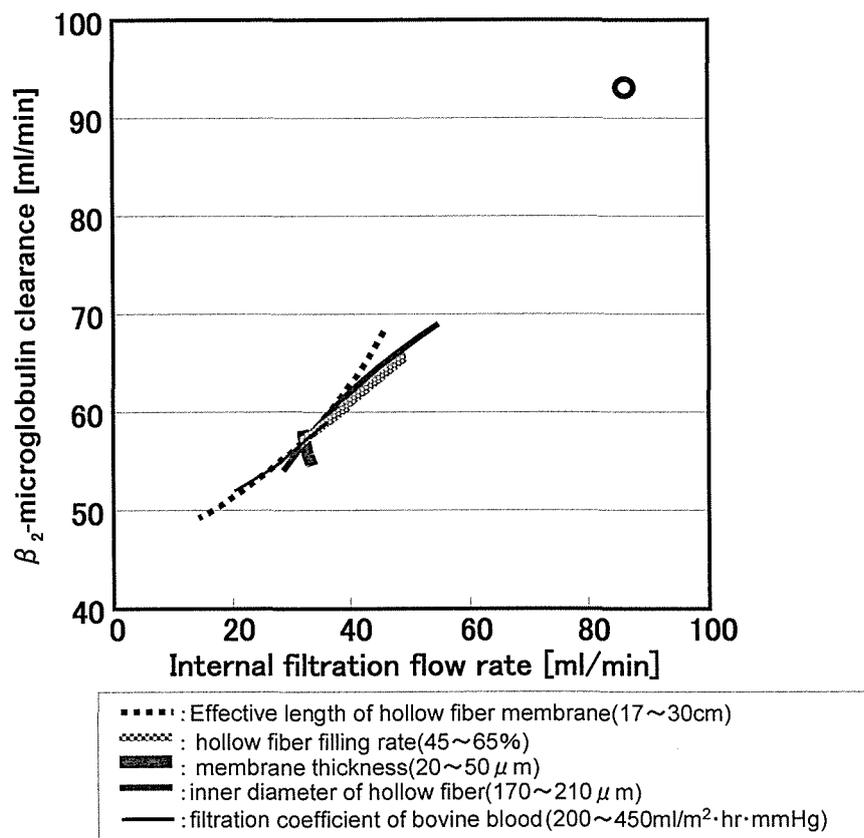


Fig.2-33 Relationship between internal filtration and clearance of β_2 -microglobulin for morphological parameters (Theoretical calculation). Condition for calculation at open circle point: Effective Area of Membrane=1.6m², inner diameter of hollow fiber=180 μ m, Effective length of hollow fiber membrane =25cm, membrane thickness=40 μ m, hollow fiber filling rate =60%, filtration coefficient of bovine blood=55 ml/m³/hr/mmHg, reverse filtration coefficient of bovine blood=466 ml/m³/hr/mmHg, Qf=16ml/min

牛血を用いた灌流実験から、正・逆濾過係数を求め、内部濾過量を推算した。ただし、今回の理論計算式は円周方向の速度分布などの不均一性は考慮しておらず、γカメラなどの直接観察の結果と対応させることにより、さらに精度を上げることが期待される。しかしながら、今回の方法は簡便であり、スタンダードな形状のダイアライザーでは簡単に内部濾過を評価することができるので有用と思われる。

中空糸内径、中空糸有効長、糸束充填密度、濾過係数などを組み合わせることにより、性能を大幅に改善できる可能性を示した。これらは、性能的には非常に魅力的ではあるが、内部濾過量の増加を伴っており、同時に透析液の血液への流入が起こるため、透析液の清浄化を伴う管理下で実施されるべきものである。また、内蔵されている中空に対して均一に内部

濾過・逆濾過が加わる状態で有れば問題ないが、部分的もしくは糸欠陥などによって、局所的に流動が不均一になった場合には流れが悪い部分で内部濾過が強まり、血液が濃縮されることにより残血を助長する懸念もある。今後は不均一性に対応するモデルの改良も試みる必要がある。

(2) 有効長を長くしたダイアライザーの性能検証

有効長を長くした場合には、血液側の流動抵抗により、血液入口側の圧力が高くなるため、入口における濾過が促進されることが予測される。ここでは、ロングタイプモジュールとして東レ（株）製 BS-1.6UL を、およびショートタイプモジュールとして同社製 BS-1.6U を用い、機能分類法に従って、 β_2 -microglobulin の測定および内部濾過の計算を行った。また、得られたパラメーターを用いて、性能及び内部濾過について計算を行った。Table 2-2 にダイアライザーの仕様を示す。

Table 2-2 Basic characteristics of artificial kidney with various effective length of hollow fiber

	Long type moodule	Short type moodule
Effective Area of Membrane [m ²]	1.6	1.6
Inner diameter of hollow fiber [μ m]	200	200
Effective length of hollow fiber membrane [cm]	250	190
membrane thickness [μ m]	40	40
hollow fiber filling rate [%]	52	52
Inner diameter of module [mm]	39	44

Fig.2-34 は内部濾過状況を計算した結果であり、血液入口から出口に向かったの、血液側から透析液側への濾過量を示している。負の値は、逆濾過が起きていることを示している。Fig. 2-35 には内部濾過のイメージ図を示した。ダイアライザーの血液側入り口付近においては強い濾過が起っており、出口付近では逆濾過が起きていることが、明らかであり、ロングタイプモジュールにおいてより多い内部濾過が起きていることがわかる。

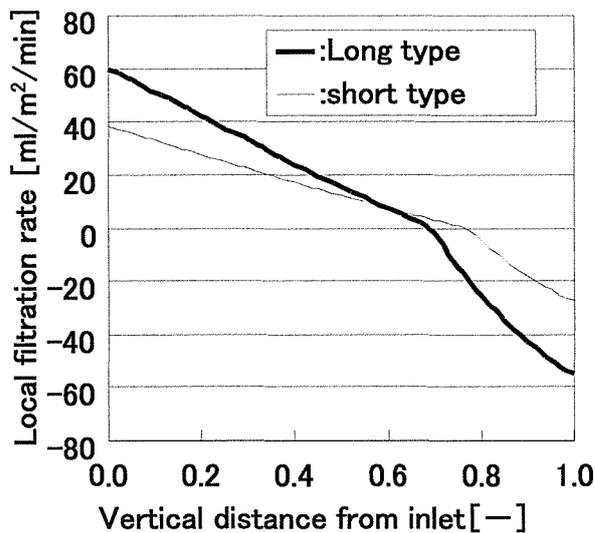


Fig.2-34 Variation of filtration along its vertical direction

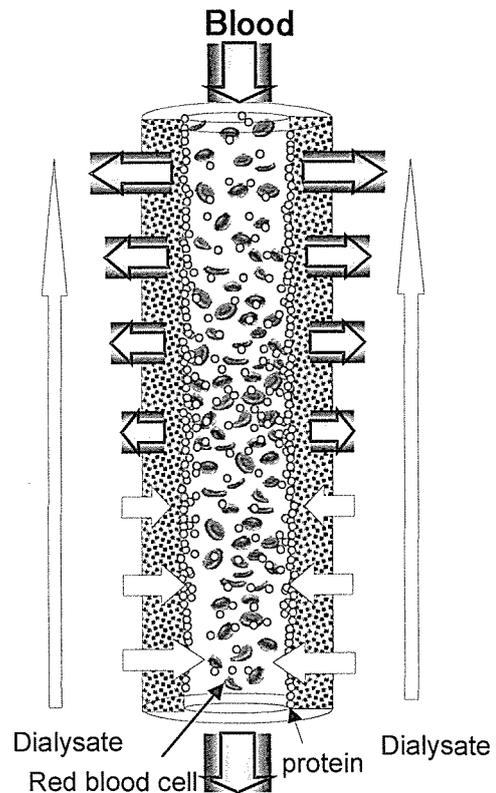


Fig.2-35 Schematic drawing of filtration inside a hollow fiber

2 - 5 まとめ

本章では、ILM-AK の設計に必要な基礎データの研究について述べた。素材の研究においては、膜モジュール基材である疎水性のポリスルホン (PSf) を水溶性のポリマーであるポリビニルピロリドン (PVP) を用いて親水化処理した。このときの表面構造を各種の方法を用いて解析したところ、親水性ポリマーに強固に付着する不凍水とある程度水が運動できる自由水が存在し、表面では親水性ポリマーが膨潤している構造であることを示した。親水性ポリマーが効果的に存在することにより、タンパク質から血小板などの細胞成分までの吸着を抑制できることを確認し、血小板の吸着などでは特定の表面存在量を有する状態から急激に減少することを明らかにした。さらに、中空糸膜でも親水性ポリマーを使用していない膜に比べて付着が抑制されていることを確認した。これらの結果から、この中空糸膜を用いる

ことにより、ある程度、生体成分との無駄な相互作用、ストレスを抑制させた中空糸膜モジュールを作製することができると考えられ、リポソーム固定化中空糸膜に PSf/PVP 膜を用いることとした。

また、リポソームを膜に導入したモジュールを作成して、基礎的な評価を行ったところ、透水性については、半減するものの、人工腎臓としては十分であることが確認できた。また、潜在活性ペプチドを吸着分離して抗酸化ストレス機能を付与し、体内の酸化ストレスを抑制するモデル実験について検討した。さらなる調査がさらに詳細に必要であるが、SOD Lipozyme 充填型 LLM を用いて、(i)リポソーム充填、(ii)ペプチド分離、および(iii)SOD 様活性の誘導が可能である事を示した。

これらのことから、リポソームを導入した中空糸膜モジュールでも、バッチ系で得られた知見と同様の現象を発現させることが可能であることが示唆された。しかしながら、ここでリポソームは固定化されていないために、溶出が起こり、高濃度のタンパク質と接触すると融合も起きてしまう。やはり、長期間保存して使用するためにはリポソームを固定化した膜であることが望ましいことも明らかとなり明確な課題と設定された。次章で述べるリポソーム固定化中空糸モジュールができれば、リアクターとして活用できるものと考えられる。

最後に、リポソーム固定化中空糸モジュールを設計する上からも、モジュール内の流れを把握することが重要である。人工腎臓内の局所的な濾過バラツキの原因は、内部濾過の影響であり、これを予測するシミュレーションシステムの確立を試みた。その結果、本シミュレーションに基づいてトータルの濾過性能を向上させる人工腎臓の開発に成功した。本手法を用いて、人工腎臓のモジュール設計・解析を行うことが可能であり、将来動物実験、臨床試験を行う上で必須の手法として活用できるようにした。

第3章 リポソーム固定化中空糸膜(ILM-AK)の創製

3-1 緒言

リポソーム（リン脂質二重層膜）には水和層とその表面の上の疎水性層を含むナノレベルで秩序化された界面（～5nm）が存在する。リポソームは、例えば静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合安定性などの複合的な相互作用を通して分子を認識できることが報告されている(Kuboi et al.,1997;Yamahara et al.,1998; Kuboi et al.,2006; Bui.H.T et al.,2008)。また、リポソーム膜自体の新しい見方として、最近、ストレス状態下で誘導される様々な現象が報告されてきている(Kuboi et al.,2008)。例えば、(a)タンパク質のリフォールディングを介助するシャペロン分子としての機能 (Kuboi et al.,1997;Yoshimoto et al.,1999; Kuboi et al.,1997;Umakoshi et al.,2007)。 (b)ストレス条件でのタンパク質の膜透過(Umakoshi et al.,1998)。 (c) 膜融合のメディエーターもしくはイニシエーターとしての機能 (Yoshimoto et al.,1999;Manayame et al.,2002), (d) LIPOzyme 機能 (Liposome+ Enzyme) (Nagami et al.,2004; Nagami et al.,2005.,1997;Yoshimoto et al.,2005; Tuan et al.,2008;Umakoshi et al.,2008)などである。これらが、明らかにされるに従って、リポソーム（または LIPOzyme）を基盤とする分離／反応システムの設計・開発が可能になってきた。

このようなシステムを完成させるために、リポソームを固定する手法を開発することは、重要である。これまでに、リポソームを固定化させて分子認識素子とした各種の分析手法が報告されている。例えば、(i)リポソーム固定クロマトグラフィー (ILC) /リポソーム固定化膜 (ILM) や(ii)リポソーム固定化センサー (ILS) などが挙げられる。上記の分析法で、リポソームが分子認識素子として利用できることが示され、リポソームとの分子間相互作用を、電荷、疎水性、水素結合安定性などの独立したパラメータとして解析可能である事も報告されている。同時に、上記の固定化リポソーム技術は、ストレス状態にあるタンパク質の相互分離に、そして、タンパク質リフォールディングカラムに適用されることも可能である。リポソームの固定化方法としては、(a)物理的なトラップ法(Yang et al.,1994), (b) 抗原-抗体法(Yang et al.,1998), (c) 疎水性のリガンド法(Hara et al.,2000), (d) 共有結合法(Yang et

al.,1999)などがある。これらの固定化方法をバイオセパレーション用途に利用することは可能であるが、リポソームの固定化量、安定性、カラム操作の困難性またはスケーラビリティの問題などがある。したがって、上記の問題を解決するために高密度でリポソームを固定化した新規固定化リポソームマトリックスを開発することが望まれていた。

中空糸膜モジュールは、水処理、バイオメディカル用途に広く用いられており、さらに上記の問題を解決するための強力なツールと考えられる。最近、リポソームが固定化された平膜が報告されているが(Yamamoto.A,卒業論文 2001), 安定性は高くなく、実使用できるものではない。中空糸膜からなる膜モジュールは、いくつかの企業にて生産されており、多くの用途で利用されている。ここでは、この膜自体の形態に着目して、効果的なリポソーム固定化方法を開発した。

本研究では、PSf/PVB 中空糸膜を用いており、その構造は孔サイズが段階的に外側から、中空糸の内部になる

ほど狭くなっている

非対称構造を有して

いる。リポソームは

Fig.3-1 に示される

ように、ポリマーゲ

ルマトリックスを通

して多孔質スペース

に集積して固定し、

リポソーム固定化膜

(ILM-AK)を得た。

リポソーム固定化は

リポソームの安定性

により評価し、

ILM-AKの基本特性

は、アミノ酸の分配

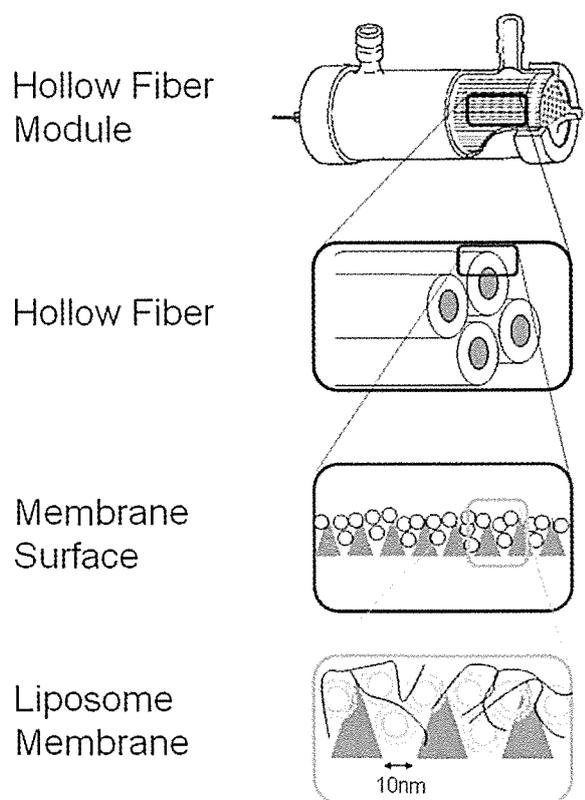


Fig.3-1 Conceptual Illustration of Immobilized Liposome Membrane Module with Follow Fibers

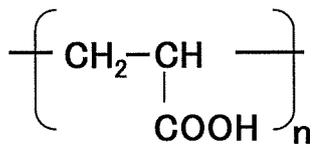
特性, タンパク質の吸着特性により評価を行い, リポソームが有する本来の機能が維持されているのかを確認した.

3-2 実験

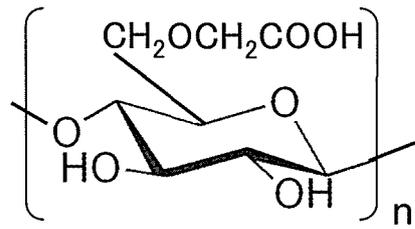
3-2-1 リポソーム固定化マトリックスゲルの創製

(1) 試薬

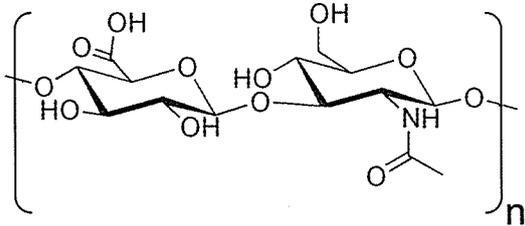
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC)は日本油脂社製のものを用いた. 1,2-DiPAAlmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(CapBiotinyl)(Sodium Salt)(Cap Biotinyl) は Avanti 社製, Polyacrylic Acid (PA), carboxymethyl-cellulose (CMC), hyaluronic acids (HA), xanthan gum (XG)などの親水性のカルボキシル基を有するポリマーは和光純薬工業社製のものを用いた. それぞれの化学構造を **Fig.3-2** に示した. 親水性のNH₂基を有する harbpolyethyleneimine (PEI)は Sigma-Aldrich (USA)社製のものを用いた (**Fig.3-3**). Calcein は和光社製, リポソーム膜を修飾させる Rhodamine-phosphatidylethanol amine (Rh-PE)は Molecular Probes 社製を用いた. Water soluble carbodiimide hydrochloride (WSC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) および HOBt (1-Hydroxy-*1H*benzotriazole, monohydrate) は同人化学社製, TritonX-100 は Sigma-Aldrich 社製, Insulin, From Bovine PAAncreas(Insulin)は Sigma-Aldrich 社製, Lysozyme, from Egg White(Lysozyme) は和光純薬工業社製, その他の分析試薬は和光純薬社製のものを用いた.



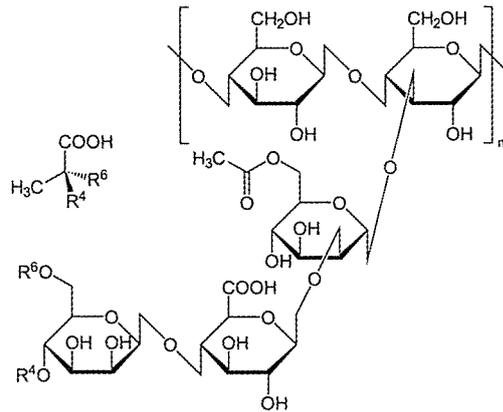
Poly(acrylic acid)(PAA)



Carboxymethyl cellulose(CMC)



Hyaluronic acid(HA)



Xanthan gum(XG)

Fig.3-2 Chemical structures of anionic polymer group

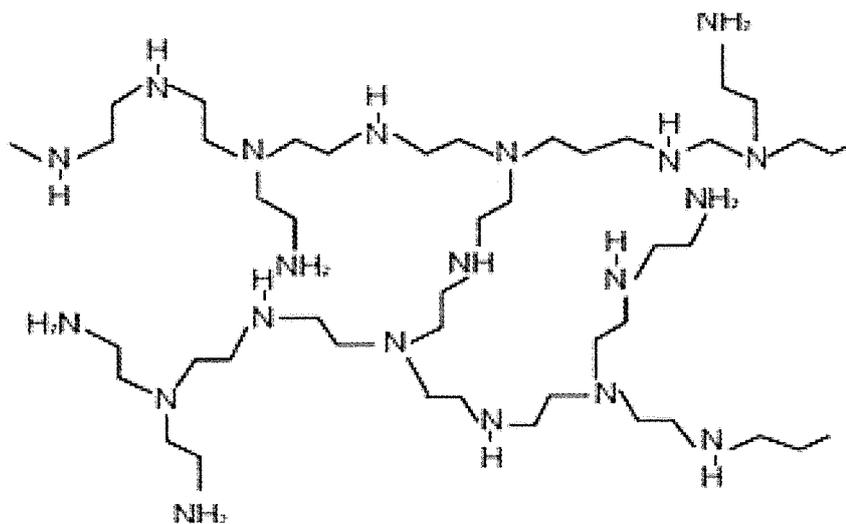


Fig.3-3 Chemical structures of polyethyleneimine

(2) リポソームの準備

Rh-PE1mol%とCap Biotinyl1mol%を含むPOPCリポソームを次の方法にて調整した。リン脂質をクロロホルム/メタノール(2:1)で可溶化し、溶剤を減圧留去の後、得られた脂質薄膜を少なくとも3時間、真空中で乾燥した。脂質薄膜はバッファー溶液ないし100mM Calcein溶液によって水和し、多重層リポソーム(MLV: multilamellar vesicle)を調製した。MLV溶液に、凍結(-80°C)-融解(相転移温度以上)を5回繰り返し、100nmの孔径のポリカーボネートフィルタを用いて、粒径を調整した。

(3) ゲルの調整

PAA,CMC,HA,XGなどのアニオン性ポリマーとカチオン性のPEIからなるゲルはWSCを用いるカルボジイミド法を用いて調整した。アニオン性ポリマーはエタノールに溶解させたWSC (11mg/ml)とHOBt (11mg/ml)によって活性化させ、PEI溶液を添加することによって架橋体を形成させた。このときのPEI濃度は0.1 – 1 wt%, 室温にて反応を行った。得られた親水性ゲルの含水率は乾燥前後の重量変化により求めた。

3-2-2 固定されたリポソーム膜モジュールの準備

(1) 膜モジュールの操作

中空糸100本からなるミニモジュールは、東レ社製ダイアライザー：“トレスルホン”TS1.6ULを解体して得た中空糸膜を充填して作製した。モジュールは内径1mm、トータル長さ130cmのシリコン製チューブ回路に接続した。このときのトータルボリュームは3mlであった。送液ポンプには、アトー社製AC-2120ペリスタリックポンプを用いた。圧力計はろ液側に設置した。使用前には不純物を取り除くためにモジュールをバッファー溶液にて洗浄して用いた。溶液中のリポソーム濃度は吸光度 (OD₄₀₅)にて求めた。リポソームからのCalcein漏

出はUV吸収（415nm）にて測定した。膜モジュールに固定化されているリポソーム中の Calcein量は1wt% Triton X-100溶液を用いて、リポソーム構造を破壊させた後に測定を行って求めた。

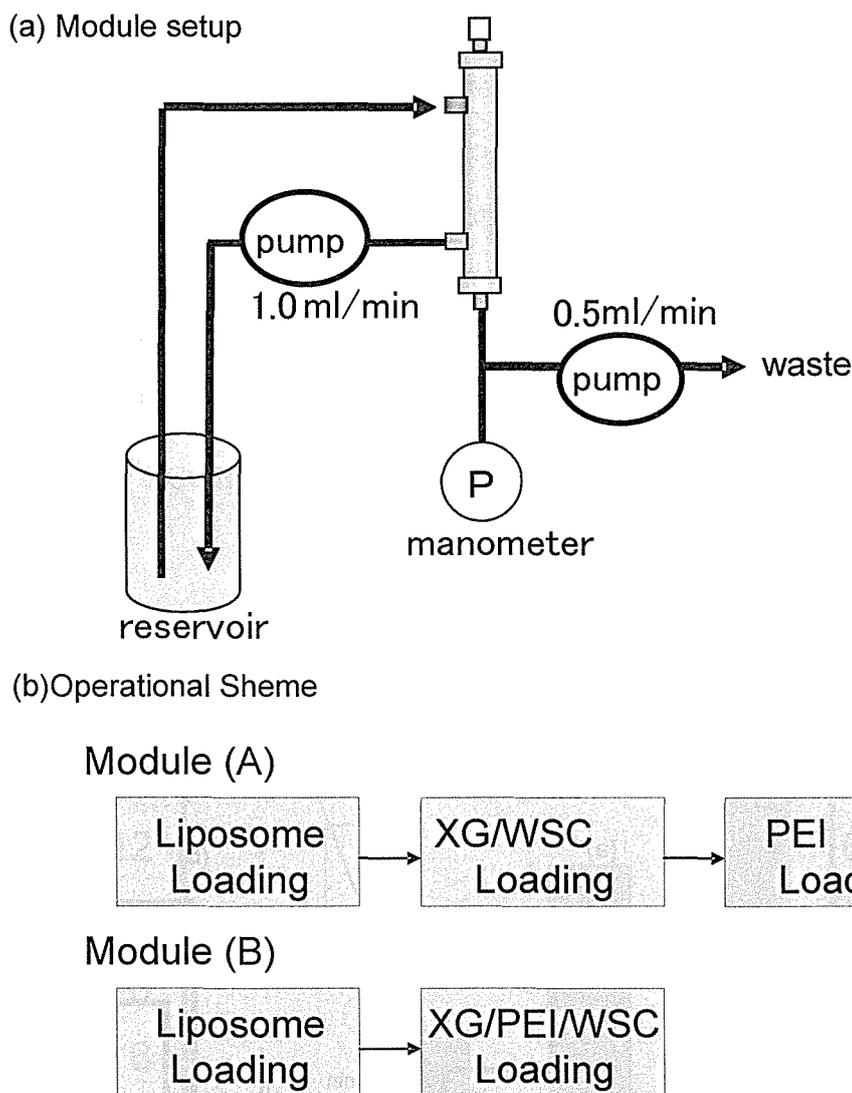


Fig.3-4 Polymer cross-Linking method for liposome Immobilization using hollow fiber membrane with gradient size exclusive pore

(2) 固定化リポソーム膜モジュールの準備

Fig.3-4に示すように、上記の前実験結果に基づいて、固定化リポソーム膜モジュールを調製した。リポソーム固定化のためのスキームをFig.3-5に示す。膜のモジュールの透析液側(フ

ファイバー膜の外部)はリポソームやポリマーなどのサンプルを含むリザーバーに接続した。この流路にはペリスタリックポンプを装備した(Fig.3-4(a))。これは、大きな細孔を有する比較的広い空洞が透析剤側に存在するためである。溶液は、血液側(ファイバー膜の内部)からペリスタリックポンプと圧力計を接続した流路(Fig.3-4(a))にろ過しその後循環させた。

3-2-3 アミノ酸の分配測定およびタンパク質の吸着特性

(1) アミノ酸の分配測定

Fig.3-5に実験装置図を示した。アミノ酸の分配に関しては、phenylalanine(Phe)およびglycine(Gly)を用い、濃度を3点以上変えて、全濾過条件にて測定した (Fig.3-5a)。測定は、同一モジュールを用いて、低濃度から順次測定した。

(2) タンパク質の吸着特性

IF-ILMへのタンパク質の吸着特性はより均一な流れとするために中空糸外側も液を流しながら実施した (Fig.3-5b)。タンパク質としては、 p 値が異なるLysozymeとInsulinを用いた

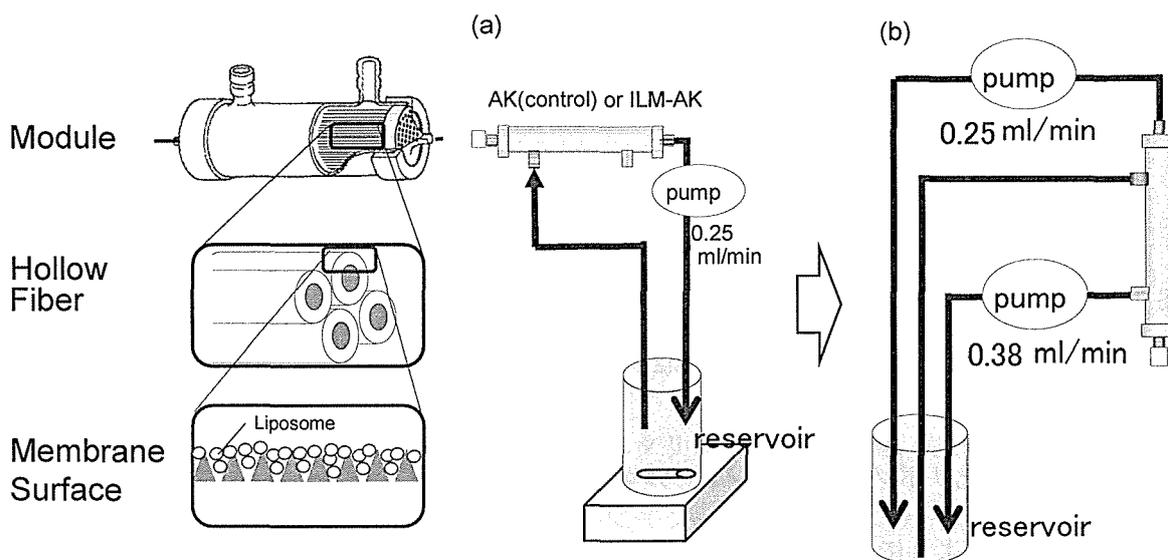


Fig.3-5 Schematic illustration of Experimental setup for the (a) amino acid partitioning experiment and (b) protein adsorption experiment

3-3 結果および考察

3-3-1 ヒドロゲルを形成するPolyions活性化複合体

カルボキシル基グループを有する陰イオン性ポリマーに、polycation上のアミノ基をカップリングさせる方法で架橋する事によりヒドロゲルの調製が可能である。固定化リポソーム膜モジュールを調製する前段階として、活性化したポリイオン錯体ならびに陰イオン性ポリマーにより調製されるヒドロゲルの特性について検討し、ここではゲルの含水率という視点から評価した。PAA, CMC, HA, XGなどの数種類の負電荷ポリマーを用いて、ヒドロゲルを調製した。対イオンを有するカチオン性ポリマーとして、ポリエチレンイミン(PEI)を使用し、WSCによるアミノカップリング法を用いて、ゲルを形成した。Fig.3-6に同濃度条件の異種の陰イオン性ポリマーとPEIを用いて調製したゲルの含水倍率を示す。本研究で用いたポリマーの中では、XG> HA> CMC> PAの順で含水率に順列があり、XGにて最大値を示した。

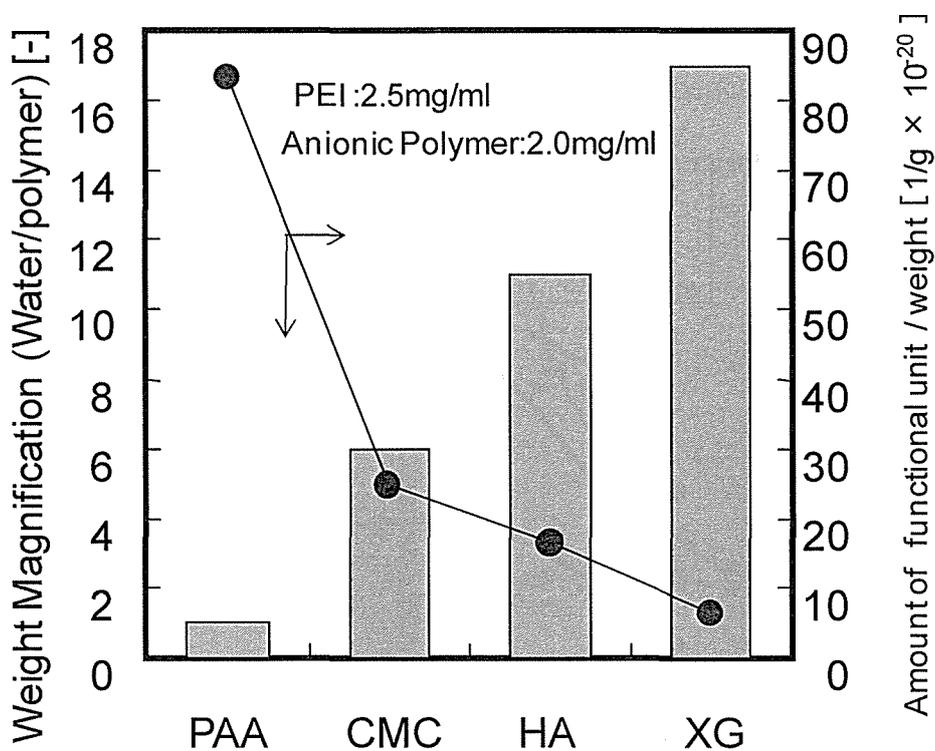


Fig. 3-6 Comparison of Water Contents of Gel Prepared with Various Polymers

上記の含水率は、ヒドロゲルの物理的な特性にも関連性があった。例えば、PAA/PEIゲルは固体のような特徴を示すものの、HA/PEIゲルとXG/PEIゲルは柔らかい性状を示す。しかしながら、HA/PEIゲルの場合、カップリング反応開始後、4時間で、固体ゲルに変化した。このような傾向は、ポリマー構成ユニットのカルボキシル基の密度に起因するものと考えられる。PAAには、単一の単量体単位あたり1つのカルボキシル基が存在し、ポリマー分子が多くの架橋点で連結されている。また、CMCに関するすべての水酸基グループがカルボキシメチル基によって置換されているため、CMCのカルボキシル基密度も高い。これに反して、親水性ポリマーとして利用される、HAとXGの両方が1重合体の単量体ユニット単位で低いカルボキシル基密度を持っているのが知られている。HAは、2グルカン分子(2glucosamino-グルカン)あたり1個のカルボキシル基があり、また、XGは分岐した5グルカン構造単位に1.5個のカルボキシル基がある事が知られている。ポリマーの単位ユニット当たりのカルボキシル基の理論上密度をFig.3-6に示した。ゲルの含水率はカルボキシル基密度と比較的よい対応関係にある事がわかった。

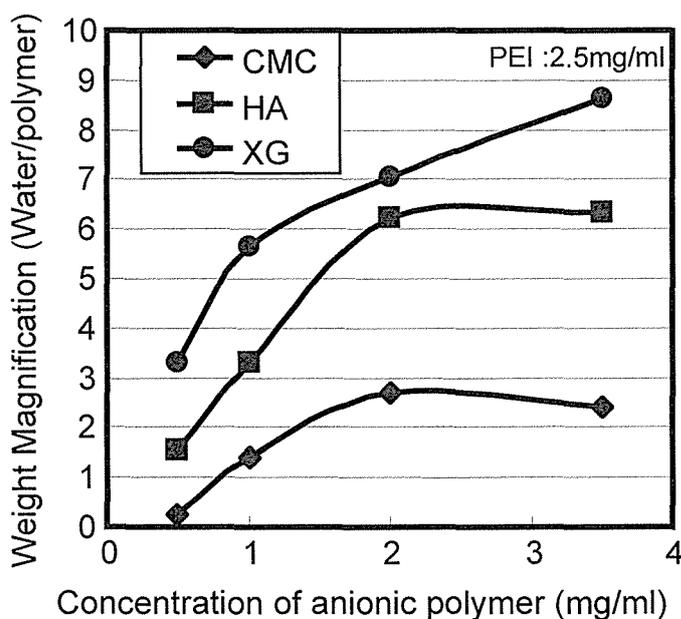


Fig. 3-7 Effects of concentration of anionic polymer prepared with various polymers

3-3-2 XG/PEIゲル製剤のための操作条件の影響

さらに、含水率を高めることができる天然系の高分子であるCMC,HA,XGについて、詳細に濃度依存性を調べた (Fig.3-7). 濃度と親水性高分子量が増えるほうが、含水率が高くなる傾向にある。ただし、CMCとHAは2mgを超えると増大効果はなくなるか、もしくは減少する。XGは2mgを超えても増加傾向を維持しているが、粘性が高くなりすぎて取扱性がかかなり悪化する。これらのことから、最適値は2mg/ml近傍であると推測した。

次に、XG/PEIゲル生成への調製条件の影響について検討した。

Fig.3-8に示す様に、ヒドロゲルの含水率に対するPEI濃度の影響について検討した。アニオン性ポリマーとは逆に、PEIの濃度が低下するほど、含水倍率が上昇した。希薄なPEI濃度条件では、ヒドロゲルは全く形成されなかったが、臨界PEI濃度(0.25mg/ml)以上では、XG/PEIゲルが形成される事がわかった。XGとPEI溶液が水溶液中

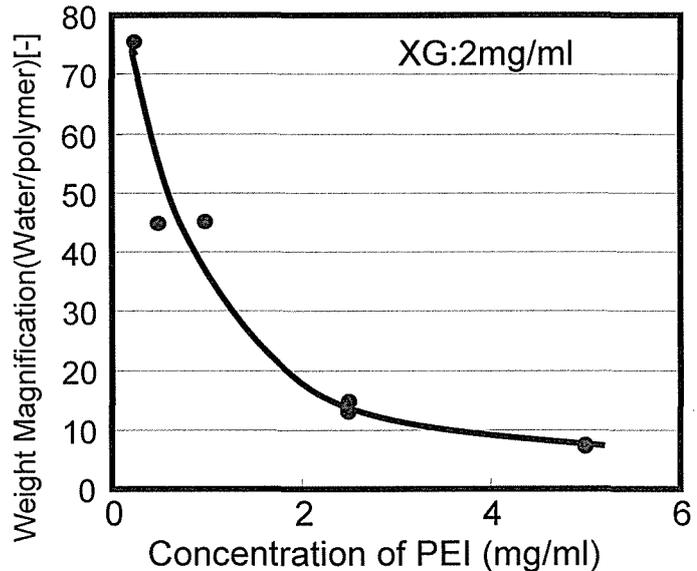


Fig. 3-8 Effect of concentration of PEI

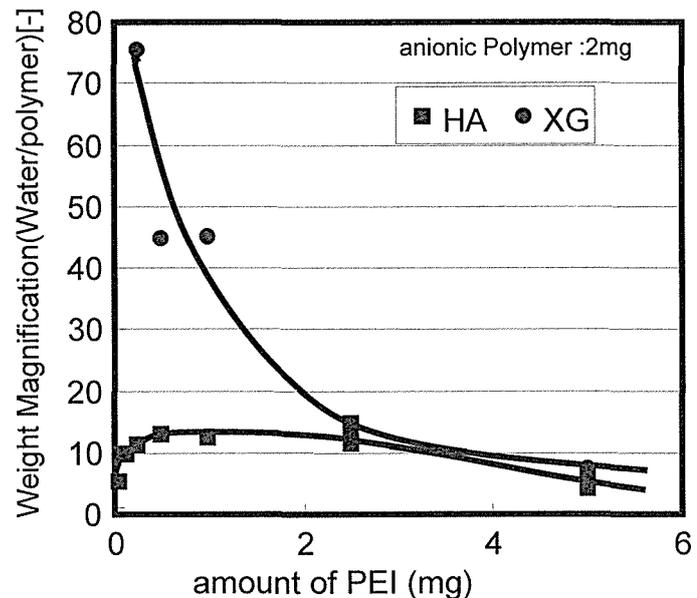


Fig. 3-9 Comparison of water contents of gel prepared with HA and XG

でポリオン錯体を形成する事が予測されるが、今回使用したポリマーは高分子量であるために分子全体がポリオン錯体を形成するとは考えにくい。ヒドロゲルを形成するこの臨界濃度は、高分子溶液の振舞いを形成する相分離挙動との関連性があると思われる。PEI濃度の増加に伴って、ヒドロゲルの含水率は減少しているが、これは、このコンプレックスの形成が増えていることを示しているのではないかと考えられる。

Fig.3-9にこのPEI の効果をHAと比較した結果を示した。高濃度領域においては同じレベルの倍率を示すが、低濃度領域においては、XGのみが、高倍率になり、著しい差が存在することがわかった。XGもPEI も分岐型の分子構造であるために、全体が広がりやすい構造をとるが、HAは直鎖型のポリマーであるために、コンパクトに凝集する構造をとりやすいことが考えられる。その他、HAそのものが凝集構造をとりやすいことが原因として考えられる。

次に、PEI分子の含水率への影響について検討した。Fig.3-10に各種分子量、濃度のPEIに対するPEI分子の含水率の結果を示す。どの分子量のPEI においても濃度を低くすることにより、含水倍率が高くなることがわかった。Fig.3-11にはPEI2.5mg/mlでの分子量とヒドロ

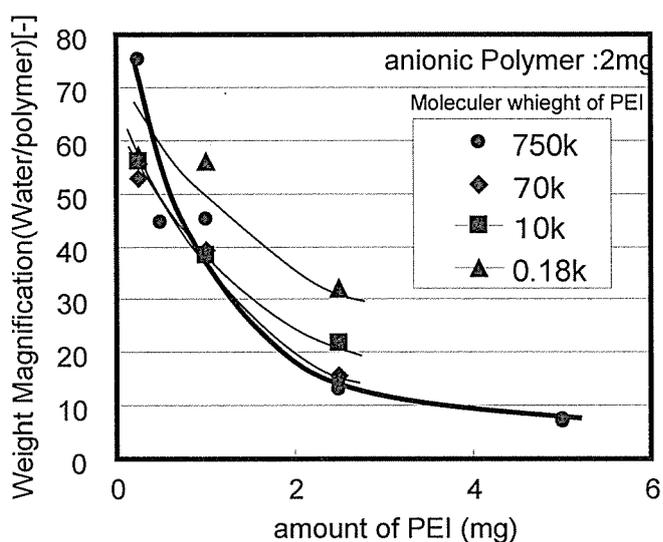


Fig. 3-10 Comparison of water contents of gel prepared with various PEI

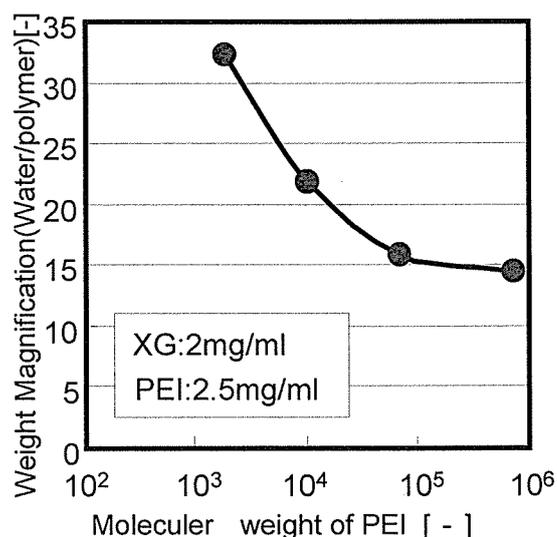


Fig. 3-11 Effect of molecular weight of PEI

ゲルの含水率との関係を示す。PEIの分子量が低い場合、高分子量のPEIより高い含水率を示すことがわかった。前項で議論したように、ヒドロゲルはポリマー間の架橋ポイントの増加に伴って、固体のような性状になる。上記のPEIの分子量の効果は、ヒドロゲルの架橋点に依存し、低分子量のPEIほど緩やかな架橋点が多く存在するものと考えられる。

リポソームを充填の後、上記のゲルを中空糸膜モジュールで調製する事を想定して、リポソーム自体の添加効果について検討したが、リポソーム添加はXG/PEIゲルの含水率に影響しない事が確認された。適切な含水率を有するゲル調製を考慮した場合、2mg/mlのXG 2.5mg/ml PEIが有効であることがわかった。

3-3-3 ILM-AKの作製と膜特性

最初に、100nmのPOPCリポソームを、ハウジング側から充填した(Fig.3-4(b)ステップ I)。リザーバーの濁度変化から、流速1ml/minで40分後に全てのリポソーム (99%以上)が充填された事が確認でき

た(Fig.3-12)。WSCで活性化したXG(1mg)の水溶液は、PS膜上のリポソームの空隙スペースを充填するために、20分間、モジュールに流加した。ほとんどすべてのXG分子が高分子量(平均したmolecularの重さ: 2000kDa)であ

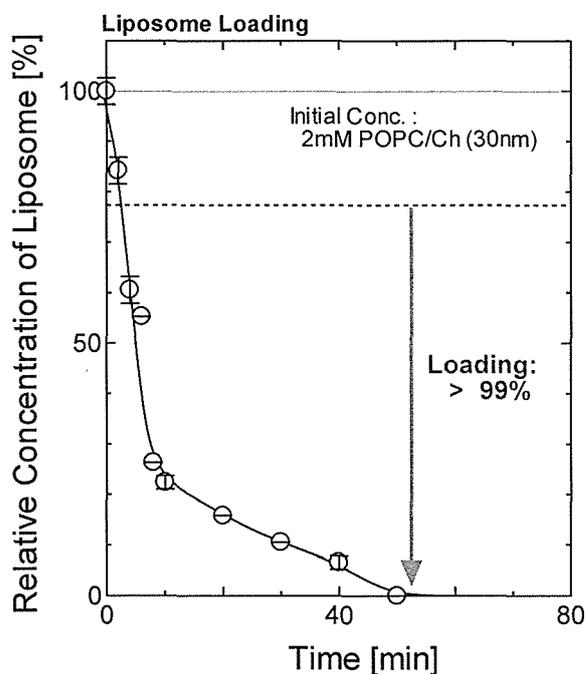


Fig.3-12 Typical Example of the Clearance (Entrapment) of Liposome in Hollow Fiber Membrane Module as a Function of Loading Time. Flow rate was set at 1.0 ml/min. Total volume of the module and flow tubes was 3.7ml and the sample volume was 10 ml, resulting in the 0.78 dilution of sample at infinite time. Liposome used

るために、PS膜の緻密層側に捕集する事が可能である(Fig.3-4(b)ステップII)。最終段階になって、XG/PEIゲルを調製するために、PEIの水溶液を、PS膜に導入した(Fig.3-4(b)ステップIII)。この操作によって、圧力がPSfの間で低下した後に、2.0kPaから4.7kPaに増加した。上記の知見は、ゲルがPS膜のチャンネルの中に形成されたことを示しており、透水性はゲル生成の後には低下するが、顕著な低下は見られず、分離に利用可能であることを示唆している。

固定されたリポソーム膜モジュールの写真イメージをFig.3-13に示した。POPCリポソームは、固定された量のリポソームを見積もるために、内水相を100mM calceinで、膜表面をRhodamine-PEで着色した。未処理のモジュール(control)と比較して、Module(A)は蛍光でラベルされたリポソームが中空糸膜モジュール内部に観察できる。さらに、20分間、膜のファイバーの内側の側面から外側に逆圧を負荷して水を流しても蛍光に大きな影響は見られない事がわかった。逆圧実験の結果は、リポソームがXG/PEIのゲルマトリックスの中で固定化されていることを示している。対照実験として、XGとPEIをゲル形成と同時にモジュールに導入する手法を検討した(XG/PEI混合物をリポソーム充填(ステップI)の後にモジュール

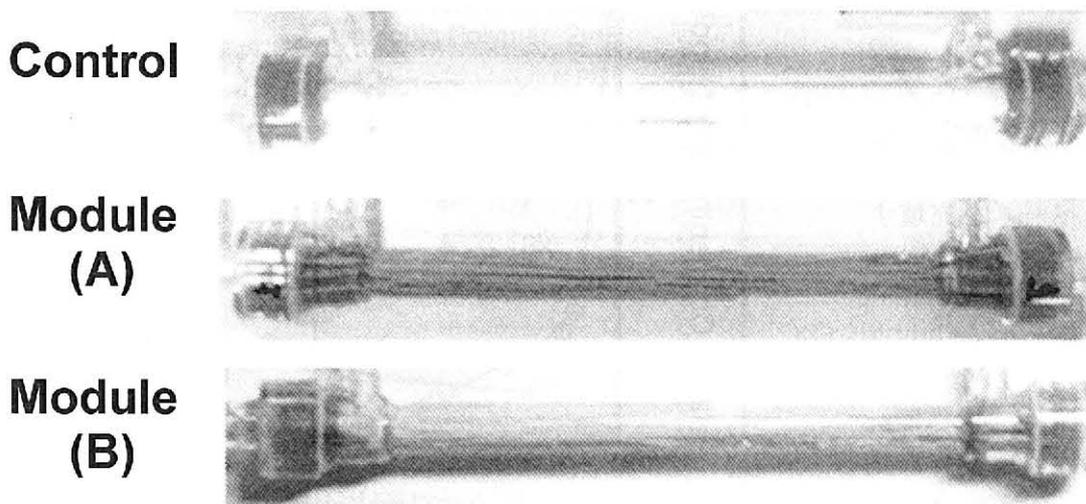


Fig.3-13 Immobilized Liposome Membrane Module Prepared with Different Conditions. 100mM Calcein was entrapped in POPC Liposome modified with 1mol% Rhodamine-PE.

ルに充填). Module(B)はその結果であり, 上記の場合と同様に, CalceinとRhodamine-PEの色は観測されるものの, 蛍光色は薄いものに留まった.

得られたILM-AKの特性をさらに解析するため, (i)リポソーム固定化量, (ii)固定化リポソームの安定性, ならびに, (iii)膜のモジュールの濾過特性について検討した. 臨界ミセル濃度以上の界面活性剤が存在する場合, リポソームの構造は破壊され, 内部からCalceinが容易に漏出する. Calceinはリポソーム固定化量の推算の手段として使用した. ここで, Calcein漏出量は固定化したリポソーム濃度に比例する. Triton X-100溶液(1wt%)は, リポソーム膜の可溶化のために膜のモジュールに導入し, 漏出したCalceinから固定化脂質量を推算した(Table 3-1). ポリマーを順次導入するModule(A)の場合, ゲル化と同時に固定化したModule(B)より10倍高い固定化量が得られる事がわかった. 上記の知見は, リポソーム間隙でのゲル形成挙動に依存するものと考えられる. 上記の知見をこれまでに報告のあるILC担体の結果と比較した(Table 3-1). ILM-AKでは固定された脂質の量は2,100mmol/mlを示し, ILCの固定化量より40-50倍程度高い事が示された. ILM-AKとILCの違いは, 固定方法の違いに起因すると考えら

れる. ILCにおけるリポソームの固定の場合では, 固定化されるゲルの表面に依存する. しかしながら, リポソームを最初に中空糸モジュールに充填する現在の方法は, 膜の空隙を利用できることや, さらに, 空隙をポリマーで埋没する

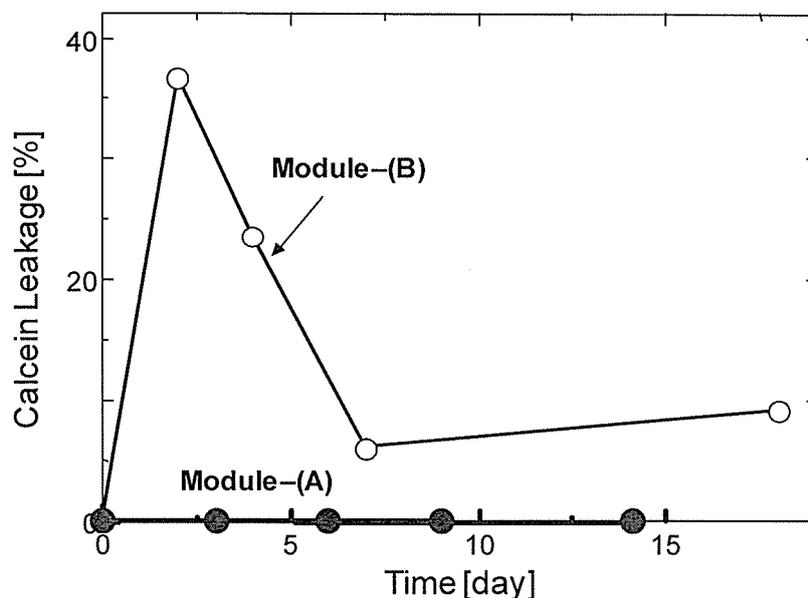


Fig.3-14 Time Course of Leakage of Calcein from the Liposome Immobilized on Hollow Fiber PS-Membrane Module

事が可能であり、より高効率にリポソームを固定する事が可能である。また、原理的には、各種異なる種類のリポソームの固定化も可能である。

一方、PS膜の表面で固定されたリポソームの安定性は実用化のための重要な要素となる。上のILM-AKが調製された後でのCalcein漏出の時間的経過を測定した結果をFig.3-14に示す。Module(B)の場合、Calcein漏出が高い事がわかったが、Calcein漏出がModule(A)の場合では観測されなかった。Calcein漏出、ILCでは、Calcein漏出は少なくとも3週間観測されなかったことが以前に報告されている(Liu X-Y et al., 2005)。非常に多孔性の膜(セルロースアセテート膜)に固定されたリポソームの場合は、Calcein漏出のライフタイムは、高い剪断応力のためにそれほど大きくない(5日間)こともわかっている(Yamamoto.A,2001)。また、ILSでの固定化リポソームは1週間安定であった。ここでのILM-AKではCalceinの顕著な漏出が見られず、少なくとも2週間安定であった。この結果は、分析用途ならびに分離用途にも、固定化リ

Table 3-1 Characteristics of Liposome-Immobilized Matrix

	Matrix Type	Immobilization Method	Amount of Immobilized Lipid [mmol -lipid/ml - matrix]	Stability (Calcein Leakage) [%]	UFRS [ml/(hr m ² kPa)]
Control Module	PS Membrane	None	0	—	850
ILM -Module -(A)	PS Membrane	XG/PEI(Sequential)	2,100 (*1)	0.89 (*5)	230
ILM -Module -(B)	PS Membrane	XG/PEI(Preforming - Gel)	150 (*1)	72.0 (*5)	410
ILC	Sepharose	Avidin -Biotin	37.6 (*2)	0.53 (*6)	—
ILC	Sephacryl	Avidin -Biotin	41.5 (*2)	0.77 (*6)	—
ILC	Sephadex	Avidin -Biotin	30.2 (*2)	1.08 (*6)	—
ILC	TSK	Avidin -Biotin	30.3 (*2)	0.74 (*6)	—
ILC	TSK	Covalent Binding	34.2 (*3)	-	—
ILM	Cellulose	Covalent Binding	14.5 (*4)	81.2 (*7)	—

*1 The amount of the immobilized lipid was calculated from the calcein leakage after the solubilization of immobilized liposome by using Triton X-100 solution. (See experimental section)

*2 Yang Q, Liu X-Y, Ajiki S-I, Hara M, Lundahl P, Miyake J. *J. Chromatogr. B*, **707**, 131-141 (1998)

*3 Yang Q, Liu X-Y, Yoshimoto M, Kuboi R, Miyake J. *Anal. Biochem.* **268**, 354-362 (1999)

*4 Data from Unpublished Work

*5 The value was calculated as the accumulated amounts of calcein for several days at 25°C against its total amounts

*6 The value was recalculated based on the previously-reported data (Yang Q, Liu X-Y, Ajiki S-I, Hara M, Lundahl P, Miyake J. *J. Chromatogr. B*, **707**, 131-141 (1998))

*7 The value was recalculated based on data from unpublished work

ポソームは安定である事を示している。また、透水係数(UFRS)をTable3-1に示す。値はILM-AKの場合にわずかに減少したが、透析使用には50 ml/(hr·m²·kPa)以上であれば十分可能であり、230ml/(hr·m²·kPa)は適切である。すなわち、(i)リポソームを高濃度で固定化可能であり、(ii)高い安定性を有し、さらに、(iii)遜色のない濾過特性が得られるILM-AKを調製可能である事が確認できた。

3-3-4 ILM-AKのアミノ酸分配特性

ILM-AKとリポソームを固定化していないcontrol (AK) について、phenylalanine, glycineの吸着挙動を調べた。Fig.3-15に得られた吸着等温線を示した。濃度上昇とともに吸着量も増大しており、溶液系吸着では一般的なFreundlich型になっており、Langmuir型に代表されるような飽和吸着量が明確に示される領域ではなかった。比較的疎水性の高いphenylalanineを用いてILM-AKとcontrol (AK)を比較すると、ILM-AKの方が多く吸着することがわかった。また、親水性の高いglycineと疎水性の高いphenylalanineとを比較すると、phenylalanineの方が2倍以上多く吸着していることがわかる。これらの結果からリポソームが固定化されていることによる特性変化を確認することができた。得られた吸着等温線からILM-AKとAKの局所疎水性因子 (HF) を求めた。Fig.3-16に示すように、両者ともにPOPCリポソームとほぼ同じ場所に位置づけられ、親水性が高いことが分かった。

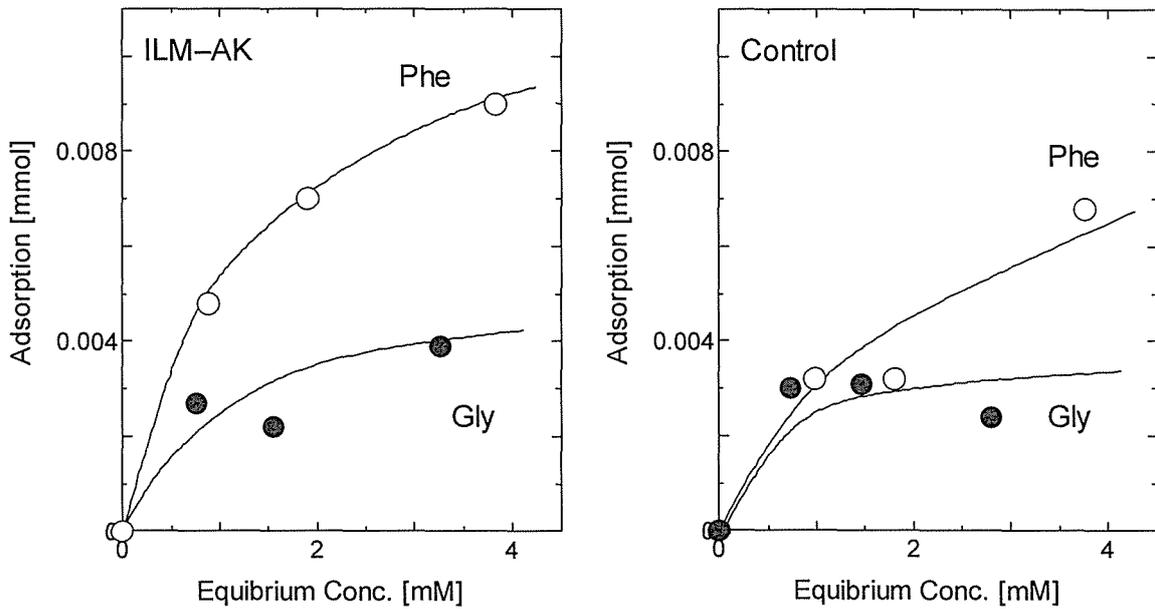


Fig.3-15 Adsorption behaviors of amino acids on ILM-AK and AK(control)

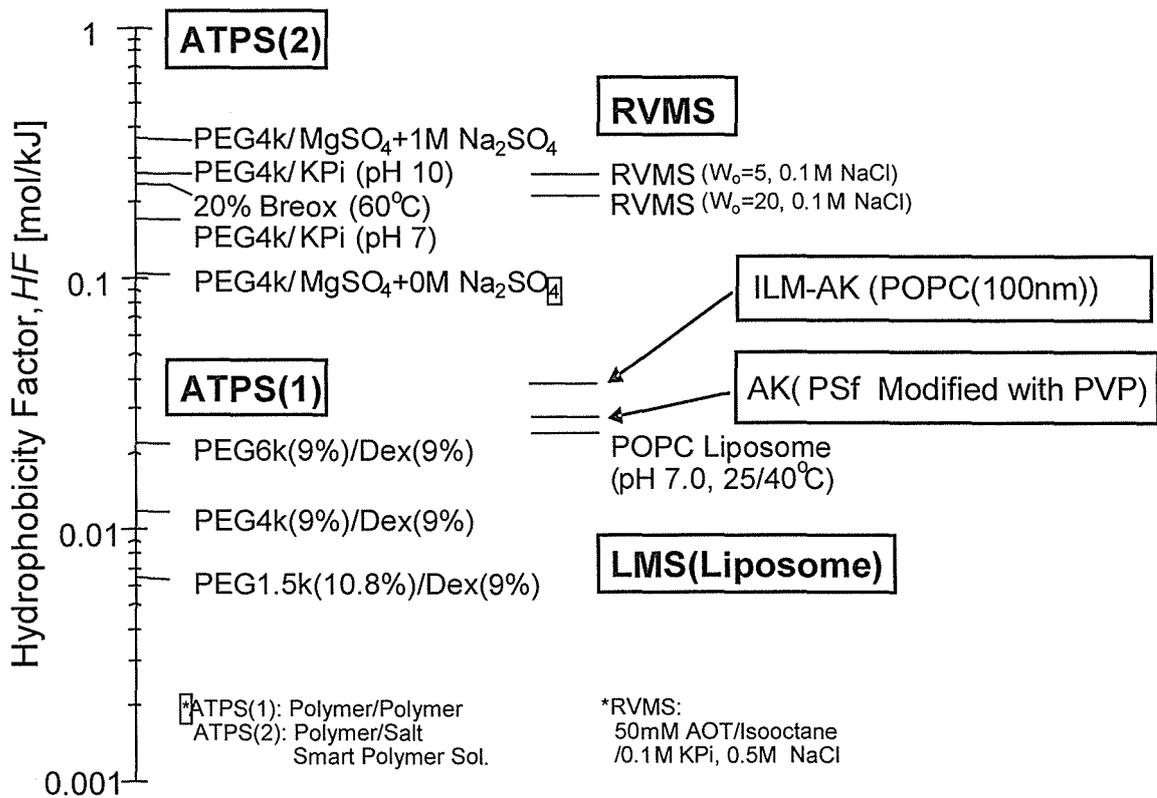


Fig.3-16 Hydrophobicity factor of ILM-AK

3-3-5 ILM-AKのタンパク質吸着特性

アミノ酸においては、リポソームの効果が維持できていることを確認することができたが、タンパク質レベルでの効果を確認するために、InsulinとLysozymeを用いて吸着特性を確認した(Fig.3-17). 水素結合安定性 (ρ 値) の高いLysozymeではILM-AKとHFはほぼ同じ吸着関係を示した. すなわち、60~120分後における安定した状態での濃度に着目すると、AK, ILM-AK共に濃度が初期濃度の60%弱に低下しており、膜単体での吸着は40%弱であることがわかる. 一方、 ρ 値の低いInsulinにおいては、リポソームの存在しないAKでは、Lysozyme同様に40%程度の吸着であるが、ILM-AKにて強い吸着が認められ、120分後においてはさらに30%弱の吸着増加が認められた. ρ 値が低いタンパク質においてはリポソームに対して相互作用が強くなり、吸着様の挙動を示すことも考えられる. これらのことから、ILM-AKはリポソームの特性が残されているデバイスであることを確認することができた.

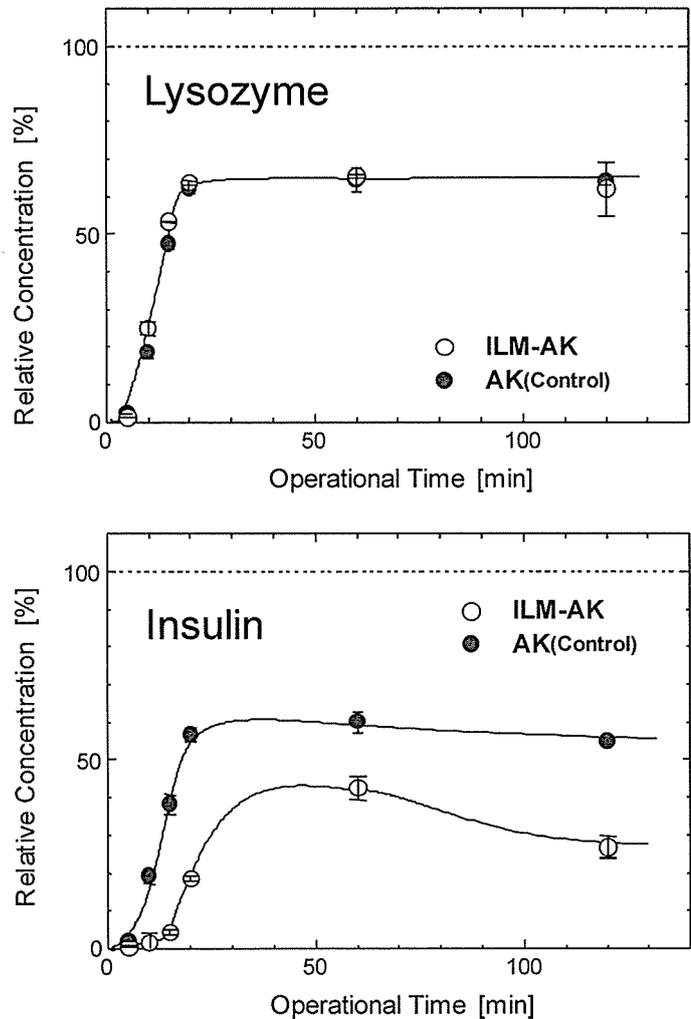


Fig.3-17 Time Course of relative concentration of proteins

3-4 まとめ

透析患者のストレス負荷状態を改善するために、モデル生体膜(リポソーム)が分離膜の中に内包されたりポソーム固定化膜モジュールの創製を試みた。固定化のために、リポソームをマトリックスゲルで内包させることを考案し、天然型の高分子を活用する事も視野に入れた。各種マトリックスゲルの特性を解析した結果、天然高分子である XG を用いることにより、非常に高い含水状態のゲルを作製する事が可能である事がわかった。XG を PEI と架橋剤を用いて架橋させたゲルであれば膨潤倍率が 50 倍（含水率 98%）程度の高含水率化が可能であることがわかった。また、このゲルでリポソームを膜表層の空隙に内包できることも確認した。さらに、人工腎臓用中空糸膜モジュール内部に固定化することにも成功し、この ILM-AK に内包固定化されたりポソームは最小限 2 週間程度、安定に存在することを確認した。また、固定化されたりポソームの機能確認として、アミノ酸の分配特性、タンパク質の吸着特性を確認し、ILM-AK においては、疎水性のアミノ酸の吸着が強く、さらに、Insulin などの p 値の低いタンパク質との相互作用が強いことを確認することができた。したがって、ILM-AK を最大限に活用するためには、このリポソームの特性をよく把握した上に、カラムとしての反応条件（接触時間、分離膜としての機能との併用）をよく考えて、活用することがポイントとなってくる。次章では、この機能を活用することに対して行った結果を示す。

第4章 ILM-AKの次世代型新規人工腎臓としての評価

4-1 緒言

透析治療をうける患者は、2007年末時点で、27.5万人と言われている。既存の人工腎臓では、分子量が数千以上の物質にも毒性があるという中分子量仮説が提唱されて以降、 β_2 -microglobulin など、腎不全患者が代謝できない過剰な血液成分を膜分離技術によって高精度にふるい分け除去する事に主眼が置かれている(第1章)。しかし、変性を受けて高分子量化した状態のタンパク質凝集体に対しては、ほとんどなす術がないのが現状である。さらに、腎不全患者は元来、腎機能が低下しているがゆえに体内環境は強いストレス状態にあると言っても過言ではない。その上、週3回の体外循環治療が必要であり、体外循環のデバイスが人工物から作成されているゆえに非常に強いストレスを受けることになる。その結果として、心臓や血管にストレス負荷がかかり、血管の老化が進むと言われており、健常人に比べて、約20歳血液年齢が更新しているという報告もある。さらには、心・血管障害からの死亡が、透析患者の死因の1番目を占めている。

第1章～第3章では、既存の膜透析技術に必要とされる最小限の機能を維持しつつ、これらのストレスを低減するために新たな機能を付与する材料設計の指針を明らかにしてきた。本章では、それらの知見に基づいて創製したリポソーム固定化人工腎臓(ILM-AK)が、実際の透析患者に与える影響について検討した。ここでは2種類のモデル実験を行った。一つ目は、タンパク質のリフォールディング実験であり、molten globule 状態(3次構造は変化しているがコンパクトで比較的安定に存在する状態)のタンパク質を患者の変性タンパク質と仮定して、ILM-AKとの相互作用を調べた。二つ目は、実際の透析患者のモデル体液を、ILM-AKと接触操作させて、各種評価手法(β_2 -MG濃度、Albumin濃度、Membrane Chip解析ほか)により、操作前後の体内ストレス状態変化を解析した。これらの知見に基づいて、ILM-AKの新たな人工透析基材としての可能性について議論する。

4-2 実験

4-2-1 リフォールディング実験

(1) 試薬

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)は日本油脂社製のものを用いた。Stearylamine(SA)は和光純薬工業社製を Cholesterol(Ch) は Sigma-Aldrich 社製のものを用いた。リフォールディングを行うタンパク質として CAB (Carbonic Anhydrase from Bovine (脱炭酸酵素) (Sigma 製) (Mw:28800,pI=5.9) を使用した。正常なタンパク質の活性濃度を測定する基質には p-nitrophenylacetate (p-NPA) (和光純薬工業製試薬特級) を用いた。2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Iris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) は和光純薬工業社製を Ethylenediaminetetraacetic acid, tetrasodium salt(エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水塩,EDTA・4Na)(EDTA) は同仁化学社製, Guanidine Hydrochloride(グアニジン塩酸塩)(GuHCl)は和光純薬工業社製, Cholroform は和光純薬工業社製, Methanol は和光純薬工業社製, Ethanol は和光純薬工業社製, 1,6-Diphenyl hexatriene(DPH) は和光純薬工業社製, BCATM Protein Assay Kit(BCA)は Thermo SCIENTIFIC 社製のものを用いた。

(2) リフォールディング循環実験

Fig.4-1 に実験回路図を示した。変性 CAB 溶液 (10mg/ml) は TrisHCl(100mM,pH7.5) バッファー中で 5 M GuHCl を加えて調整した。実験は 2 ステップにて行った。まず Fig.4-1(a) の回路を用いて、変性 CAB 溶液 0.8ml を TrisHCl(100mM,pH7.5)3.2ml を用いて 5 倍希釈し、0.25ml/min の流量にて循環させた。この希釈後の濃度では CAB は molten globule 状態で循環することになる。1 時間後に Fig.4-1(b)の回路を用いて、35ml の TrisHCl(100mM,pH7.5)を流量 2.25ml/min にて導入し、トータル 50 倍に希釈し、リフォールディングさせた。TrisHCl の希釈液導入後はポンプ 1 の流量を 0.25ml/min に下げて循環を行い、経時的にサンプリングを行った。CAB の活性測定は TrisHCl(50mM,pH7.5) に EDTA・4 Na を 5mM, p-nitrophenylacetate を 1mM 添加した活性基質溶液を 50ml 調整し、加水分解反応

を起こして、348nm における吸光度の経時変化により決定した。なお、実験中は基質溶液もスターラーで攪拌し続けた。

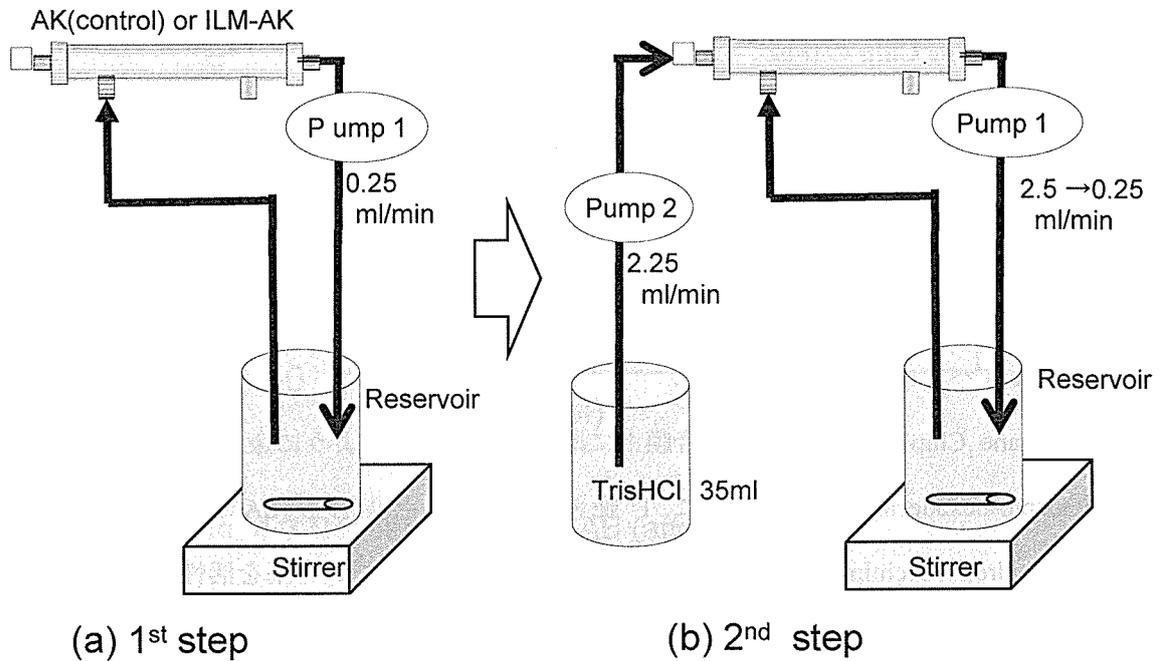


Fig.4-1 Refolding system using AK(control) or ILM-AK

4-2-2 CAPD 液を用いた循環実験

(1) 実験装置および循環方法

Fig.4-2 に実験回路図を示した。実験開始前は回路全体を PBS にて置換・洗浄を行い、ポンプサイドの液は抜いておく。腹膜透析患者 (CAPD) 廃液などの生体由来サンプルを 9ml 準備し、ポンプスイッチをスタートさせ、ろ液側の初流が出た時を実験

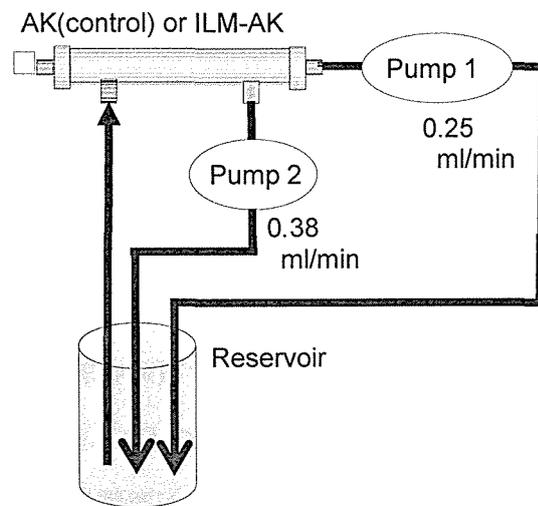


Fig.4-2 Circulation system using AK(control) or ILM-AK

開始とした。最初 10 分間は中空糸外側の循環を行わず、20 分までは最初に系内に存在した PBS での希釈を避けるために 1 パスにて廃棄した。

(2) Membrane Chip の作成

Membrane Chip 固定化用として Egg phosphatidyl-ethanolamine (EggPE)を 1mol%混合した 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)の脂質薄膜を Calcein 水溶液(100mM, pH 7.5)で水和し、凍結・融解法によりリポソームを調製した。リポソーム粒径はすべて 100nm に調整した。

Membrane Chip はセルロース混合膜上に厚み 30nm になるように金スパッタ処理を施し、16-Mercapto-hexadecanoic acid 溶液に 1 晩浸漬して自己集合膜(SAM)を形成させた。WSC/N-Hydroxysuccinimide 混合溶液により SAM のカルボキシル基を活性化した。そこに EggPE を 1mol%混合した POPC, DOPC, DPPC リポソーム溶液をそれぞれ添加し、共有結合法により電極上に固定化した。解析については、評価対象であるリポソームを Membrane Chip に添加し、固定化リポソームからの Calcein 漏出に伴う輝度の変化(ΔI)を蛍光顕微鏡下で直接評価した。リポソーム添加後 30min における Calcein 漏出率($\Delta I/I_0$)を膜間相互作用のシグナルとして採用した。膜流動性、相分離性など、生体膜を反映した組成・条件を選定した membrane library を用いて、評価対象の主成分分析を行い、主成分得点 PC1, PC2 を得た。

4-3 結果および考察

4-3-1 CAB のリフォールディング

1 ステップ目終了時の溶液中の CAB 量測定し、投入量に対して計算した結果を Fig.4-3 に示した。リポソームを固定化していない中空糸膜モジュールである AK の CAB 量は開始時と変わっておらず、タンパク質の吸着が抑制されて、安定して循環できていることがわかる。一方、ILM-AK においては、CAB 量は約半減している。これは、molten globule (MG) 状態にある CAB をリポソームが認識したためと考えられ、リポソームが固定化されている部位に吸着している状態が推定される。Fig.4-4 はさらに 10 倍 (トータル 50 倍) の希釈を

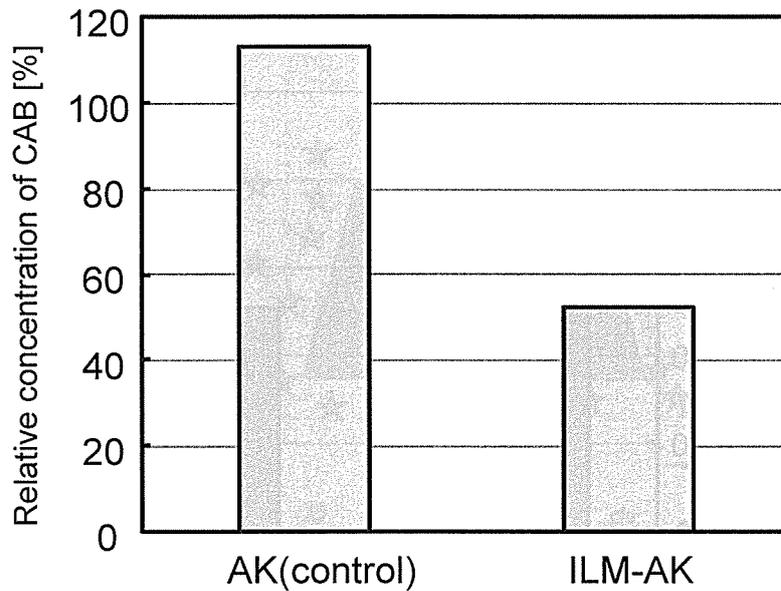


Fig. 4-3 Concentration of CAB (after 1st step)

行った後の CAB 量の変化を示した図である。コントロールの AK には濃度の低下がみられたが、ILM-AK では逆に濃度が上昇した、これは、MG 状態にて、リポソーム上に存在していた CAB がリフォールディングとともに膜表面から離れて、溶液中に戻ってきたためと考えられる。

Fig. 4-5 にはこのときの溶液中の Native CAB の割合、すなわちリフォールディング率を示した。いずれも約 80% と高いリフォールディング効率を示した。ここで、ILM-AK においては溶液中に溶解していた CAB とリポソーム上に存在していた CAB に分けてリフォールディングを考え、溶液中に溶解していた CAB からのリフォールディングはコントロールの AK と同じリフォールディング収率として計算してみると、リポソーム上からのリフォールディング率も 86% と良好な値であった。Fig.4-6 に、これらの結果から、ILM-AK にて起こった現象をイメージ図にまとめた結果を示す。この図のとおり、ILM-AK には変性したタンパク質を取り込む機能があり、正常化させて戻すことができることが確認できた。透析患者の血液においては、第 1 章にて述べたように、変性したタンパク質が多く存在しており、今回のモデル実験のように、選択的に取り込み、正常化させる機能が働けばこれまでにない、人工腎臓の機能を発現できたことになる。

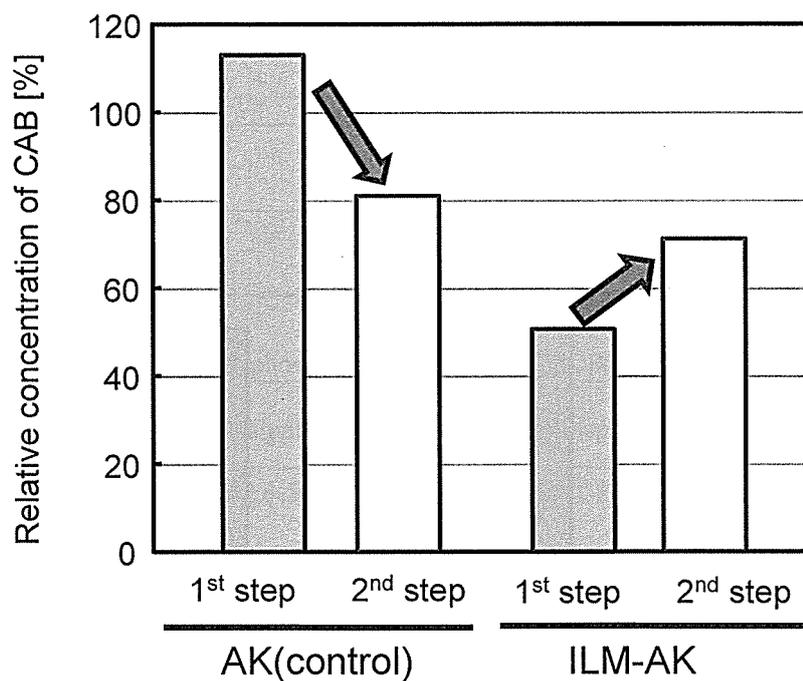


Fig. 4-4 Change of Concentration for CAB after refolding procedure (1st step to 2nd step)

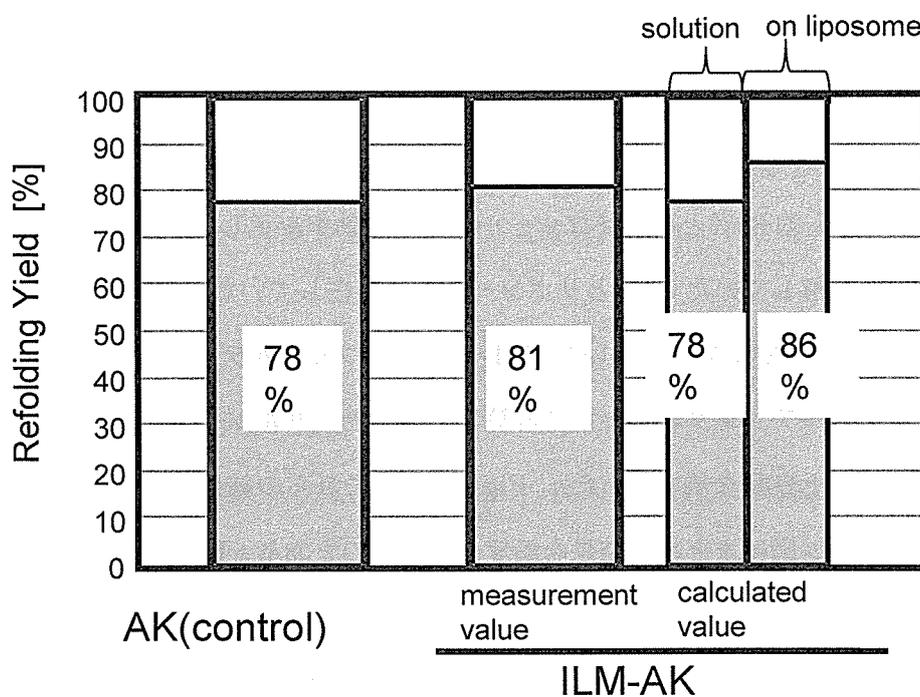


Fig. 4-5 Refolding Yield of CAB

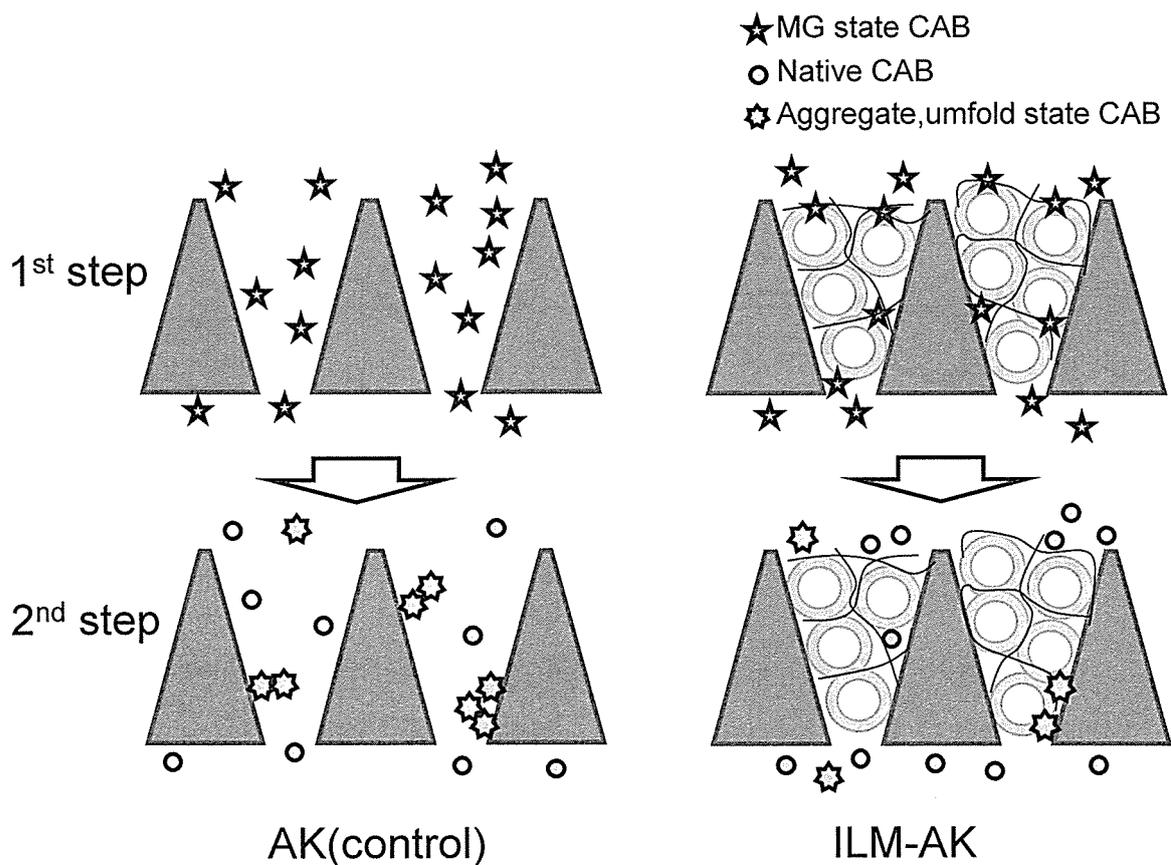


Fig. 4-6 Refolding Image

4-3-2 CAPD 液からのタンパク質除去, SOD 活性

(1) タンパク質の量的な除去

腎不全透析患者のモデル体液を Fig.4-2 の装置を用いて ILM-AK 処理した. Fig.4-7 には ILM-AK 処理時のタンパク質濃度の経時変化を示す. 最初の 15 分までは希釈の影響により, 循環液濃度に低下が見られるが, それ以降は膜モジュール全体の吸着の効果によって濃度が変化している. 物質収支より, 15 分以降のタンパク質吸着量を算出し, その経時変化を示した(Fig.4-2(b)). AK と比較して, ILM-AK を用いた場合, 吸着量が緩やかに増加する事がわかった. 12 分後の最大吸着量も ILM-AK は AK の 60%程度に抑制される事がわかった.

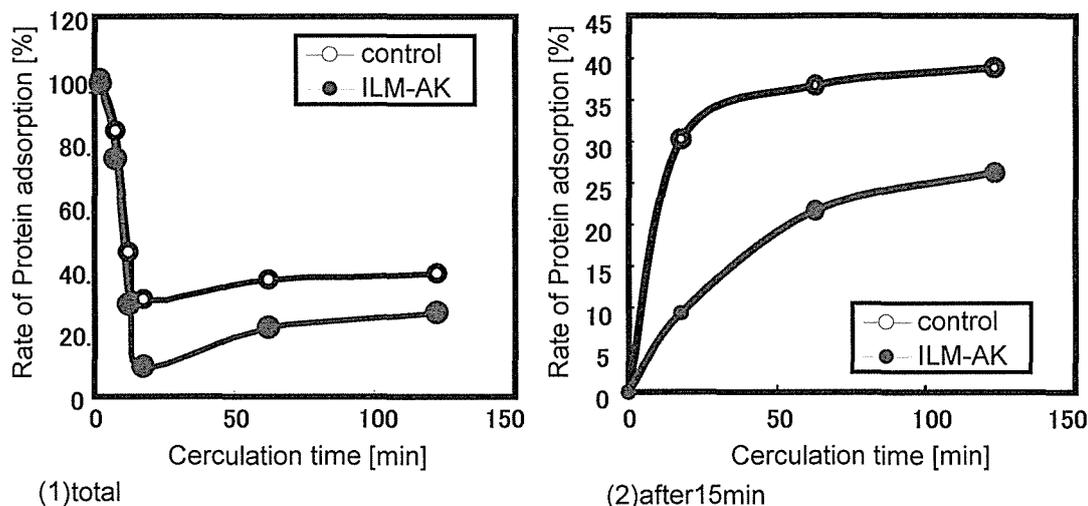


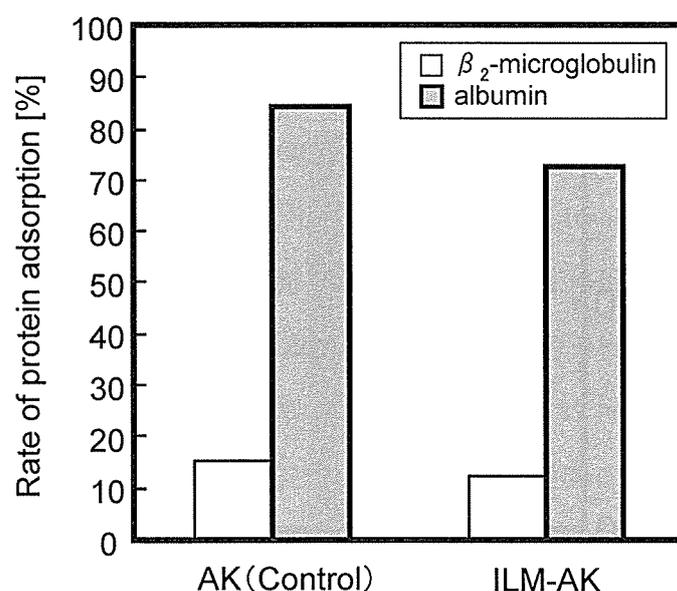
Fig.4-7 Change in concentration of protein

モデル体液中に存在する各種構成成分の変化について解析した。Table4-1, Fig4-8 には、実験開始前および 120 分後の Albumin, β_2 -microglobulin の濃度を示した。この患者体液の主成分は Albumin と β_2 -microglobulin であることがわかっており、初期には、Albumin が多量に含まれる液であったことがわかる。しかし、120 分後の Albumin 濃度は AK, ILM-AK 共に大幅に低下している。特にリポソームを固定化していない、AK については、85% 程度減少している。これの主な要因は、Albumin が膜透過性が高くないために、透析膜にトラップされた影響が大きいと考えられるが、膜および循環回路への吸着もあり得ると考えられる。

一方、 β_2 -microglobulin の吸着はさほど多くはなく、10~20%の間である。したがって、120 分後の溶液の組成は、およそ Albumin と β_2 -microglobulin が半量程度存在している混合液であるということがわかる。AK と ILM-AK を比較すると、ILM-AK の方が両タンパク質の吸着が抑制されている。中空糸膜表面および内部に親水性のマトリックスゲルおよびリポソームが存在することにより、PSf/PVP 膜表面が改質された状態になっている可能性も示唆される。以上の様に、従来から使用されている量的な指標を用いた場合でも、リポソームを固定化した膜は親水性の強い膜であることが分かる。

Table 4-1 Concentration of protein

	albumin mg/L	β_2 -microglobulin mg/L
before	530	89
AK(control) (120min)	82	75
ILM-AK (120min)	146	78

**Fig.4-8** Rate of protein adsorption (120min)**(2) 被処理体液の SOD 活性**

SOD をマーカー分子として、透析膜処理操作が体内の酸化ストレス環境に及ぼす影響について検討した。被処理液体中の SOD 活性を測定し、原液に存在する SOD 活性の低下率を算出した結果を Fig.4-9 に示した。コントロール（中空糸膜のみ）は処理前の溶液の約 18% の SOD 活性が低下することがわかった。一方、ILM-AK の場合でも SOD 活性の低下が見られるが、その割合は約 10% に低減される事がわかった。SOD 活性低下の原因として、(i) SOD 活性の低下、ならびに、(ii) SOD が吸着除去の可能性が考えられる。SOD の分子量が大きいことと、Albumin, β_2 -microglobulin の残存量が ILM-AK の方が多いことを考えると後者の要因である可能性が高い。以上の様に、ILM-AK を用いる事により、モデル体液における抗酸化酵素 SOD 活性を維持できる事が示された。今回は SOD

フラグメントの再構築による SOD LIPOzyme 効果までは実験を行うことができなかったが、表面に必要量の SOD LIPOzyme を構成することは十分に可能であるため、今後の課題に挙げて進めていきたい。

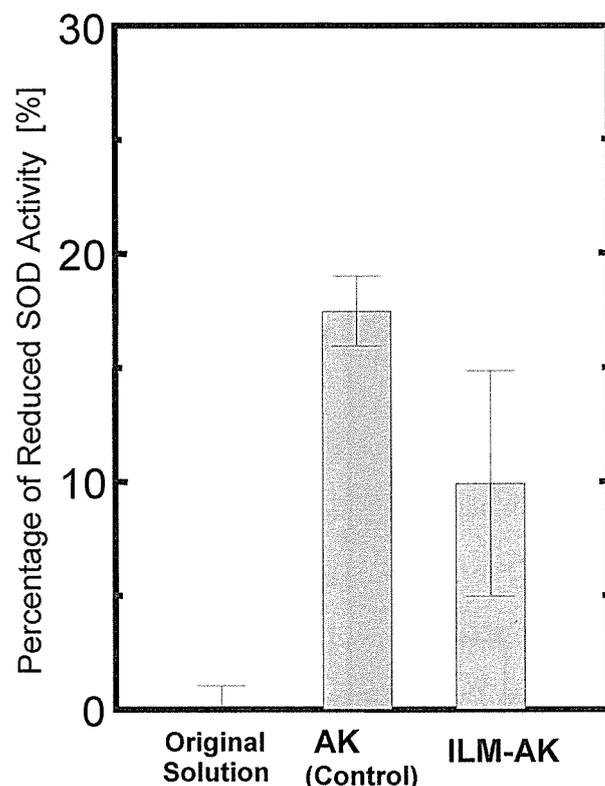


Fig.4-9 Percentage of SOD adsorption

4-3-3 メンブレンチップを用いた処理液の特性解析

メンブレンチップを用いて、処理を行った液の生体膜間相互作用の解析を行った。メンブレンチップの原理を Fig.4-10 に示す。蛍光物質 Calcein を封入したリポソームを固定化した基材とサンプル溶液を接触させて、対象試料と膜との相互作用を解析するものである。タンパク質の構造異常化に関連する基本タンパク質を標準物質とした場合、特性の異なる複数のリポソームに対する応答を解析する事により、統計学的手法(主成分分析)とも組み合わせて、対象試料(タンパク質)の構造異常状態の解析が可能となる。これまでに、Alzheimer 症関連タンパク質 A β などの対象分子の種類や物理化学的特性の推定に有効であることが示されている(Shimanouchi, 2005)。

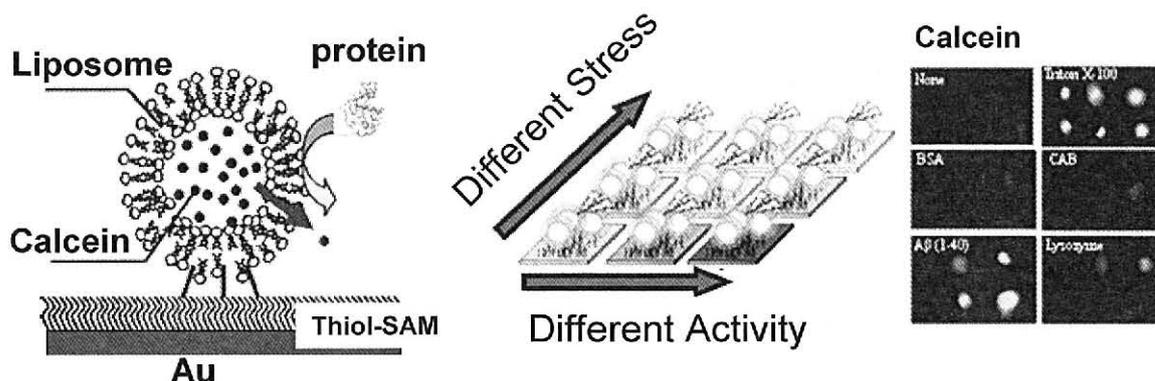


Fig.4-10 Schematic illustration of basic principle of membrane chip analysis

まず、3種類のリポソーム(POPC, DOPC, DMPC)を固定化したメンブレンチップに、各種基準タンパク質(β_2 -microglobulin, CAB, Lysozyme, Ubiquitin, Insulin)を内部標準系として添加し、Calcein 蛍光漏出から、タンパク質-リポソーム膜間相互作用を測定した。実験で得られた $n \times m$ の相互作用の網羅的情報群を説明するため、主成分分析により、新たな説明変数として PC1 と PC2 を求めた。主成分分析結果を Table 4-2 に示す。PC2 までの積算寄与率が 90% を超えているので、第2成分までで相互作用の実験結果を説明しえると判断した。次に、PC1 および PC2 と各種物性値(局所的疎水性 (LH), 水素結合安定性 (ρ 値), 電荷密度 (Z/ASA), 分子量 (Mw), 粒子表面積 (ASA), および疎水性環境の形成に伴う水素結合安定化を意味する LH/ ρ との相関係数に基づき、PC1 と PC2 をそれぞれ、タンパク質の水素結合安定性と電荷密度に帰属することができた。Fig.4-11 には、PC1, PC2 の帰属結果を踏まえて、今回実験を行ったサンプルの分析結果と共に示した。濾過実験を開始する前のスタート液は、PC 1 がマイナス側すなわち今回は ρ 値が高い側に位置づけられている。CAPD 液は多くの生体成分の混合液であるので、その理由を明確に決めることはできないが、Albumin が多く含まれている状態であるので、Albumin (BSA の ρ 値: 8.0) に近い位置に現れた可能性が高い。

Table 4-2 Data of principal component analysis

	PC1 56%	PC2 35%	Z/ASA C/nm2	LH -	ρ -	MW Da	ASA nm2	LH/ ρ -
Insulin	1.6795	0.5393	-0.142	0.6	4.2	5700	20.2	0.142857
Ubiquitin	-0.1294	-1.4950	0.000887	0.3	5.6	8500	26.4	0.053571
β_2 -microglobulin	1.5398	-0.2526	-0.058	0.2	5.2	11200	31.8	0.038462
Lysozyme	-0.9268	0.5045	0.211	0.1	6.1	15000	38.7	0.016393
CAB	-0.8181	1.3364	0.002	0	6.6	28700	59.7	0

濾過実験後60分および120分後の液は、AK および ILM-AK 共にスタート時に対して、低 ρ 値側にシフトしている。特に、AK では、Albumin が残っているにもかかわらず、 β_2 -microglobulin 単独の位置に近い場所に座標に位置し、 β_2 -microglobulin 単独ではないにせよ、すべての構成成分の平均的性質として、低い ρ 値の状態にあると言える。 ρ 値は、タンパク質主鎖骨格に存在する水素結合の平均的な疎水環境を示す値であり、この値が低いほど、タンパク質構造の安定性が低い事が報告されている。特に、アミロイド性タンパク質の ρ 値は低い。この領域はタンパク質全体としても低い ρ 値領域であることから、それらの成分だけが集まったとは考えられず、体液中のタンパク質の構造が異常な構造に変化していることが示唆される。実際、1章の Fig.1-15 で示したように、透析患者の血液をリポソーム非固定化透析カラムで処理した後のタンパク質成分のいくつかは発現量が増大したり、ペプチドに断片化するなどのストレス負荷が認められている。この結果は、Membrane Chip 解析と合致する。それに対して、ILM-AK の ρ 値は Albumin と β_2 -microglobulin の中間に位置している。PC1成分においては、スタートの状態に近く、高 ρ 値のタンパク質に近い特性になっていることが確認された。

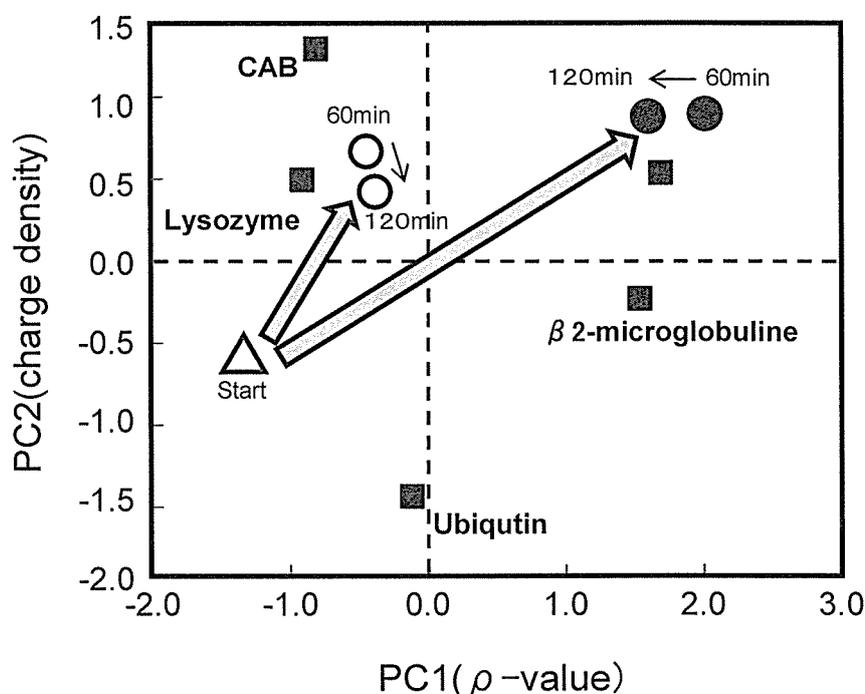


Fig.4-11 Principle component analysis of CAPD solution in Renal Failure patient treated by ILM-AK (○) and AK(Control) (●)

β_2 -microglobulin は ρ 値が低く、アミロイド性の高いタンパク質として知られている。体液中では、その他の成分により、比較的安定に存在しうる状態で存在するものと考えられる。Membrane Chip による解析結果から、透析処理した場合、モデル体液中のタンパク質の構造が異常化する事が示唆された。上記の知見は、モデル体液中において β_2 -microglobulin の特性(水素結合不安定性)が顕著化される事を示唆している。しかし、以上の知見は、ILM-AK を使用した場合、その様な傾向は見られず、タンパク質の構造状態は正常である事がわかった。リポソームは、(i)タンパク質の異常な構造を正常化する分子シャペロン様機能(Yoshimoto, 1999), (ii)構造異常性の高い(アミロイド性)タンパク質を識別する機能(Yoshimoto, 2004, Shimanouchi 2005), (iii)構造の不安定なペプチドフラグメントを吸着・再活性化する機能(Tuan 2008)など、各種の潜在機能を誘導する事が知られている。ILM-AK を用いた場合、構造異常性の高いタンパク質を吸着するものの(3章 Insulin, Fig.4-6 β_2 -microglobulin など), 他の成分との共存により正常な構造状態にあるタンパク質(CAPD 溶液中の β_2 -microglobulin, SOD など)の構造変化・吸着を抑制する役割を有するものと考えられる。以上のように、ILM-AK を用いて、体液のストレス状態を抑制もしくは緩和できる可能性が示唆された。ILM-AK 自身はリポソームを固定化したものであるが、この様なリポソームの潜在的な機能を誘導する事により、親水化のみならず、ストレス状態に応じて、新規な価値(機能)を惹起できるスマート人工臓器システムの構築ができるものと期待できる。

4-4 まとめ

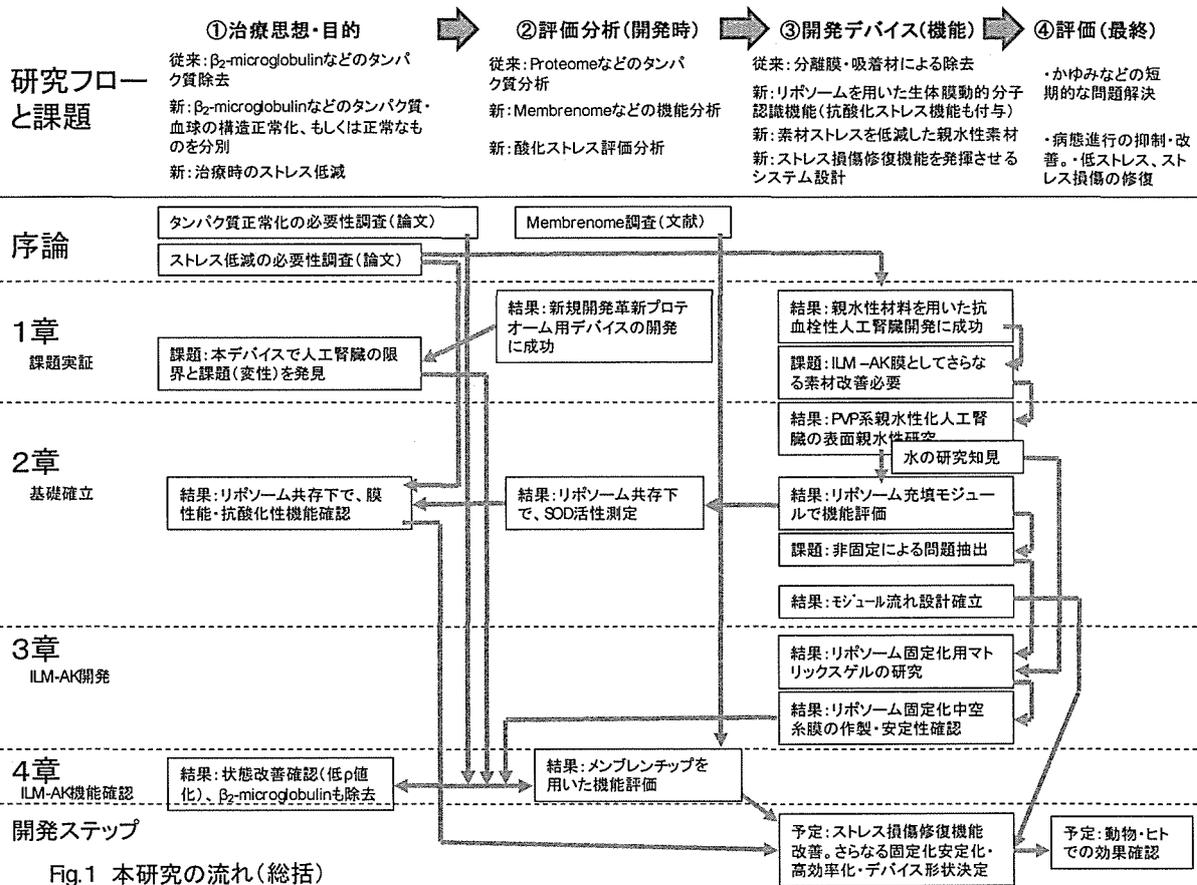
本章では、ILM-AK の人工腎臓機能としての評価を行った。生体内に存在するストレス負荷タンパク質(ストレッサ)の構造正常化,ならびに,生体内環境修復を目的として,構造異常タンパク質の正常化モデルとして,炭酸脱水酵素(CAB)のリフォールディング実験を行い,ILM-AK では構造が異常化したタンパク質を取り込む機能があること,および,高いリフォールディング特性(構造正常化機能)を示すことを確認した。透析患者の血液中のタンパク質の変性状態と今回の条件は同じではないが,今回のモデル実験のように,選択的に取り込み正常化させる機能が働けばこれまでにない,画期的な人工腎臓の機能を発現できることになる。

また,患者のモデル液として腹膜透析治療患者の置換液(CAPD液)を用いて,ILM-AK および AK を通過させたときの成分変化およびメンブレンチップによって測定することができるストレス状態の変化を調べたところ,ILM-AK では,基本的なふるいわけ性能は維持したうえで,ストレスの影響を抑制できる,新規な特性を有する膜であることが示唆された。

今回の,リポソーム固定化膜は新しい試みであるが,単なる物質の除去能でしか評価できない従来の方法のみでは,その特徴を引き出すことは難しい。今回用いたメンブレンチップでの評価方法(例えば,96ウェルタイプの自動測定器に対応した方法)が確立されれば,大量のサンプルも測定することが可能と期待される。今回の結果では,どのストレス成分が,測定に影響を与えたのかを同定することまではできないが,第1章で述べたマスト細胞刺激成分の研究のように分離・測定を繰り返すことによって,多様なストレスを系統的に解析・改善することが可能になり,適切な大きさ,構造のILM-AK を設計することができると考えられる。

総括

本論文では、腎不全患者の治療として用いられている人工腎臓の新規な人工腎臓を志向するデバイスとして、リポソームを固定化した中空糸膜デバイスおよび基材の創成と機能評価について取組み、リポソームを固定化した中空糸膜デバイス (ILM-AK) を創成することに成功した。ILM-AK は従来の人工腎臓が β_2 -microglobulin などの過剰成分を単に除く機能であったことに比べて、リポソーム本来が有する多様なタンパク質との相互作用および最近大きな問題となってきているストレスを低減する機能を付加できる画期的な治療デバイスである。本研究では、中空糸膜の分離機能を維持したうえで新たな機能を発現できることをミニモジュールスケールでの *in vitro* 評価にて確認することができた。次世代の新規な人工腎臓として有望である。以下に各章での結果を総括する。



第1章 持続人工腎臓の創製と既存人工腎臓の課題

人工腎臓の改良研究と腎不全患者の病態に関する研究について述べた。血液の凝固反応を抑制し、さらに血液にストレスを与えないように流れを工夫した中空糸膜モジュールシステムを創製したが、その一部でも不完全であると抗血栓性機能の極端な低下が誘導される事がわかった。これらを解決する次世代型デバイスを構築するために、生体適合性の高い、優れた親水性膜表面の創製が鍵となり、高性能なポリスルホン中空糸膜に適切な親水性設計を行うことが必要であることが課題として設定された。

また、腎不全患者のストレス状態を解明するために、透析患者の血液を主とする体液の研究を行った。まず、タンパク質の高精度解析を行うために、タンパク質の分離性能を飛躍的に高めたデバイスを作製した。このデバイスを用いると特定の分子量領域のタンパク質を数百倍に濃縮することが可能であり、従来にない高感度の分析を可能とした。このデバイスを透析患者に適用し、質量分析機を用いてプロテオーム解析を行ったところ、約3000種類のタンパク質を同定することに成功したが、併せて、非常に多くのタンパク質が切断・変性を受けて血液中に存在していることが明らかとなった。また、細胞刺激性を与える成分は変性タンパク質の会合体であることも示唆されるデータも他のオリジナルなプロテオーム解析手法によって明らかにすることができた。すなわち、いかに透析患者の血液が変性を受けているのかがわかり、現在の人工腎臓はストレス負荷を低減できない不完全なものであるかが、明らかとなった。これを改善する画期的な治療法が必要であるが、これらの結果より、現在の人工物からの Build-Up 型で設計する手法には大きな限界があると考えられた。そこで、単なる除去膜から、生体膜(モデル生体膜としてリポソームを使用)の機能利用をコアとする腎機能 Break-Down 型の膜の創成が必要であると考え、Build-Up, Break-Down 統合型人工腎臓の設計を試みることにした。ただし、これまでに、リポソームを含む人工腎臓の研究例はなく、まずは、リポソームが存在した場合に膜特性・透過性としてどのようなものが得られるのか、人工腎臓全体として流れを安定化させることができる設計ができるのかなどを具体的な課題として挙げ、第2章の研究にて検討することとした。

第2章 親水性ポリマーの構造解析とリポソーム固定化デバイス設計に向けた基礎検討

ILM-AK の設計に必要な基礎データの研究について述べた。素材の研究においては、膜モジュール基材である疎水性のポリスルホン(PSf)膜を水溶性のポリマーであるポリビニルピロリドン(PVP)を用いて親水化処理した。このときの表面構造を各種の方法を用いて解析したところ、親水性ポリマーに強固に付着する不凍水とある程度運動できる中間水が存在し、表面では親水性ポリマーが膨潤している構造であることを示した。親水性ポリマーが効果的に存在することにより、タンパク質から血小板などの細胞成分までの吸着を抑制できることを確認し、血小板の吸着などでは特定の表面存在量を有する状態から急激に減少することを明らかにした。さらに、中空糸膜でも親水性ポリマーを使用していない膜に比べて付着が抑制されていることを確認した。これらの結果から、この中空糸膜を用いることにより、ある程度、生体成分との無駄な相互作用、ストレスを抑制させた中空糸膜モジュールを作製することができると考え、リポソーム固定化中空糸膜に PSf/PVP 膜を用いることとした。

また、リポソームを膜に導入したモジュールを作成して、基礎的な評価を行ったところ、透水性については、半減するものの、人工腎臓としては十分であることが確認できた。また、若干の生体内に存在するストレス負荷タンパク質(ストレッサ)の構造正常化、実験を行い、ILM-AK では高いリフォールディング特性(構造正常化機能)を示すことを確認した。また、潜在活性ペプチドを吸着分離して抗酸化ストレス機能を付与し、体内の酸化ストレスを抑制するモデル実験について検討した。さらなる調査がさらに詳細に必要であるが、SOD Lipozyme 充填型人工腎臓を用いて、(i)リポソーム充填、(ii)ペプチド分離、および(iii)SOD 様活性の誘導が可能である事を示した。

これらのことから、リポソームを導入した中空糸膜モジュールでも、バッチ系で得られた知見と同様の現象を発現させることが可能であることが示唆された。しかしながら、ここでリポソームは固定化されていないために、溶出が起こり、また、タンパク質によるリポソームの破壊も懸念された。これらのことから、やはり、リポソームを固定化した膜であることが望ましいことも明らかとなり、第3章でのリポソーム固定化中空糸モジュールの検討を行うこととした。

最後に、リポソーム固定化中空糸モジュールを設計するに当たっては、モジュール内の流れを把握することが重要であり、人工腎臓内の局所的な濾過バラツキの原因は、内部濾過の影響であり、これを予測するシミュレーションシステムの確立を試みた。その結果、本シミュレーションに基づいてトータルの濾過性能を向上させる人工腎臓の開発に成功した。本手法を用いて、ILM-AK の設計・解析を行うことが可能であり、将来動物実験、臨床試験を行うためには必須の手法として活用できるようにした。

第3章 リポソーム固定化人工腎臓(ILM-AK)の創製

透析患者のストレス負荷状態を改善するために、モデル生体膜(リポソーム)が分離膜の中に内包されたリポソーム固定化膜モジュールの創製を試みた。固定化のために、リポソームをマトリックスゲルで内包させることを考案し、天然型の高分子を活用する事も視野に入れて活用を試みた。各種マトリックスゲルの特性を解析した結果、天然型キサンタンガム(XG)を用いることにより、非常に高い含水状態のゲルを作製する事が可能である事がわかった。XG をポリエチレンイミンと架橋剤を用いて架橋させたゲルであれば膨潤倍率 50 倍(含水率 98%)程度の高含水率化が可能であった。また、このゲルでリポソームを膜表層の空隙に内包できることも確認した。さらに、人工腎臓用中空糸膜モジュール内部に固定化することにも成功し、この ILM-AK に内包固定化されたリポソームは最小限 2 週間程度は安定に存在することを確認した。また、固定化されたリポソームの機能確認として、アミノ酸の分配特性、タンパク質の吸着特性を確認し、ILM-AK においては、疎水性のアミノ酸の吸着が強く、また、Insulin などの p 値の低いタンパク質との相互作用が強いなどの特徴があることが確認でき、4 章で示す人工腎臓としての基礎評価を行うこととした。

第4章 ILM-AK の次世代型新規人工腎臓としての評価

本章では、ILM-AK の人工腎臓機能としての評価を行った。生体内に存在するストレス負荷タンパク質(ストレッサ)の構造正常化、ならびに、生体内環境修復を目的として、構造異常タンパク質の正常化モデルとして、炭酸脱水酵素(CAB)のリフォールディング実験を行い、ILM-AK では構造が異常化したタンパク質を取り込む機能があること、および、高いリ

フォールディング特性(構造正常化機能)を示すことを確認した。透析患者の血液中のタンパク質の変性状態と今回の条件は同じではないが、今回のモデル実験のように、選択的に取り込み、正常化させる機能が働けばこれまでにない、画期的な人工腎臓の機能を発現できることになる。

また、患者のモデル液として腹膜透析治療患者の置換液(CAPD液)を用いて、ILM-AKおよびリポソームを固定していない単なる中空糸膜のみのコントロール(AK)を通過させたときの成分変化およびメンブレンチップによって測定することができるストレス状態の変化を調べたところ、ILM-AKは基本的な分離性能は維持したうえで、ストレスの影響を抑制できる、新規な特性を有する膜であることが示唆された。

今回の、リポソーム固定化膜は新しい試みであるが、単なる物質の除去能でしか評価できない従来の方法のみでは、その特徴を引き出すことは難しい。今回用いたメンブレンチップでの評価方法(例えば、96ウェルタイプの自動測定器に対応した方法)が確立されれば、大量のサンプルも測定することが可能と期待される。今回の結果では、どのストレス成分が、測定値に影響を与えたのかを同定することまではできないが、第1章で述べたマスト細胞刺激成分の研究のように分離・測定を繰り返すことによって、多様なストレスを系統的に解析・改善することが可能になり、ILM-AKもより適切な大きさ、構造のものを設計することが可能になると考えられる。

将来研究への提言

本論文で、リポソームを用いることにより、ストレス低減機能を付加できる画期的な人工腎臓を提案し、基本的な固定化プロセスの確立と機能確認を行うことができた。

最後に、本論文の結果を実用化に結び付けるために、今後行うべき開発に対する提言と、本研究思想の今後のさらなる可能性について述べる。

(1) リポソーム固定化中空糸膜

本研究ではゲルマトリックスを作成し、リポソームの封入を行った。この方法はどのよう

なりリポソームにも適用できるメリットがある一方、マトリックスとは結合していないために多少の溶出が起き得る。完全に溶出を防ぐにはリポソームとマトリックス自体を共有結合にて架橋させることも必要になり得る。また、タンパク質などの吸着が抑えられたといっても、第3章で確認したとおり、タンパク質の膜への非特異的吸着は残っている。今回用いた水の解析手法などを活用すれば、さらなる表面改質が期待される。このとき、親水性成分を膜表面に後反応にて固定化することも有効な手段であると考えられる。

(2) 臨床効果・ターゲティング

リポソームが、血液成分に対して多様な影響を与えることは、本研究においても複数の方法にて確認することができた。しかし、実際に臨床試験を行うためには、疾患の状態ターゲットを明確にし、改善効果も定量的に示す必要がある。このターゲティングを適切に行うことが、実用化に向けたもっとも大きな残された課題である。今回用いたメンブレンチップによる主成分分析手法は、大量に測定することを含めて、確立されつつある。このメンブレンチップとプロテオーム解析を連携させて進め、多様なストレスを系統的に解析することを進めることで、病態の新規な定量的定義と改善効果の明確化が可能になるであろう。

(3) 治療効果を得るためのモジュール設計

上記の病態設定ができた場合の治療条件は、必ずしも現在の人工腎臓膜・形態にこだわることはない。序論でも示した通り、リポソームを内表面のみに固定化する形態や、膜の厚みを数倍にして、リポソーム容量を増やすこと、さらには、プレもしくは、ポストで直列に接続して使用することも考えられる。このときには、今回検討したカラムシミュレーション技法を最大限に活用することは必須であり、ヒトに使用しても高いストレス損傷修復機能が得られるように、さらに中空糸、モジュール形状を改善し、動物、ヒトでの効果確認を進めていく。

(4) 人工腎臓用途以外への展開

今回試みた、タンパク質の構造改善は、まだ実用化されていない未来型の新しい治療概念であるが、腎臓以外にも幅広く使用することができる。特に、序論で示した酸化ストレス関連の各種の生活習慣病に対する治療にも期待ができる。また、たとえば、一時的に混入してしまった毒素の吸着除去治療などの治療形態に使用することは容易に考えられる。また、

バイオリアクターをはじめ工業プロセスでの活用も十分に考えられるため、さらに多様なデータ蓄積が期待される。

本デバイスがいち早く実用化され、世の中の治療概念が根底から変わることを期待するとともに、今後ともデバイス改善に携わっていきたい。

使用記号

A	= 単位長さあたりの膜面積	[m ²]
C	= 溶質濃度	[mol/m ³]
d_e	= 透析液側流路相当直径	[m]
D	= 中空糸内径	[m]
J_v	= 濾過流束	[m ³ / s]
k	= 境膜物質移動係数	[m/s]
L_p	= 濾過係数	[m ³ / (m ² ·Pa· s)]
N	= 中空糸本数	[-]
N_s	= 血液側から透析液側への溶質流束	[mol/s]
P	= 圧力	[Pa]
P_m	= 膜透過係数	[m ³ / (m ² ·Pa· s)]
Q	= 流量	[m ³ / s]
S	= 流路断面積	[m ²]
S_∞	= 極限ふるい係数	[-]
$UFRS$	= 透水係数 (Ultra Filtration Rate per Surface)	[m ³ / (m ² ·Pa· s)]
z	= ダイアライザー長さあたりの距離	[m]

Greek letters

μ	= 粘度	[Pa·s]
$\Delta \pi$	= 膠質浸透圧	[Pa]

Subscriptions

B	血液側
D	透析液側

引用文献

- Aoike I: Long-term clinical experience with PMMA membrane. *Contrib Nephrol* 1999;125:205-12
- Aoike I, Gejyo F, Arakawa M.: Learning from the Japanese Registry: how will we prevent long-term complications? Niigata Research Programme for beta 2-M Removal Membrane. *Nephrol. Dial. Transplant* 1995;10(Suppl. 7):7-15
- Bui H T, Umakoshi H, Ngo K X, Nishida M, Shimanouchi T, Kuboi R., Liposome membrane itself can regulate gene expression in cell free translation system, *Langmuir*, 2008, **24** ; 10537-10542
- Clermont G, Lecour S, Cabanne JF, Motte G, Guillard JC, Chevet D, Rochette L. Vitamin E-coated dialyzer reduces oxidative stress in hemodialysis patients. *Free Radic Biol Med*, 2001, **31**: 233–241
- Choi, S.Y., Kwon, H.Y., Kwon, O.B., Eum, W.S., Kang, J.H., Fragmentation of human ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide, *Biochimie*, 2000, **82**; 175-180
- Flaten, G.E., Dhanikula, A.B., Luthman, K., Brandl, M., Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, **27**; 80–90.
- Girndt M, Lengler S, Kaul H, Sester U, Sester M, Kohler H. Prospective crossover trial of the influence of vitamin E-coated dialyzer membranes on T-cell activation and cytokine induction. *Am J Kidney Dis*, 2000, **35**:95–104
- Hara M, Yuan H, Miyake M, Iijima S, Yang Q, Miyake, Interaction between a novel amphiphilic polymer and liposomes, *J. Mat. Sci. Eng. C*, 2000, **13**; 117-121
- 細谷範行, 他 : 大量液置換可能な透析器の開発. 腎と透析 **38**:94-96(1995)

- Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, Sanaka T, Hata Y, Takano T, Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody, *J. Lipid. Res.* 1996, **37** ;45-53
- Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS, Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem*, 1995, **41**:1135–1138
- Jung, H.S., H. Ishii, T. Shimanouchi, H. Umakoshi, R. Kuboi, Immobilized-liposome sensor system for detection of proteins under stress conditions, *Maku (Membrane)*, 2007, **32**; 294-301
- Jung, H.S., Umakoshi H., Son S-Y, Shimanouchi T, Kuboi R., Characterization of surface properties of chitosanase under heat stress condition using aqueous two-phase systems and immobilized-liposome sensor system, *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, 2003, **10**; 123-132
- Kobayashi S, Moriya H, Aso K, Ohtake T, Vitamin E-bonded hemodialyzer improves atherosclerosis associated with a rheological improvement of circulating red blood cells. *Kidney Int*, 2003, **63**:1881–1887
- Kobayashi T, Todoki M, Kimura K, Fujii Y, Takeyama T, Tanzawa H, Permeability and structure of PMMA stereocomplex hollow-fiber membrane for hemodialysis; in Driori E, Nakagaki M (eds), *Membranes and Membrane Processes*. New York Plenum Publishing, 1986, 507-513,
- Kuboi R, Yoshimoto M, Shimanouchi T, Umakoshi H, Immobilized liposome chromatography for refolding and purification of protein, *J. Chromatogr., B*, 2000, **743**; 93-99

- Kuboi R, Umakoshi H., Analysis and separation of amyloid β -peptides using aqueous two-phase systems under stress conditions ~from aqueous two-phase systems to liposome membrane systems~, *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, 2006, **13**; 9-21
- Kuboi, R., Umakoshi, H., Shimanouchi, T., Cutting edge of membrane stress biotechnology, *Membrane* (in Japanese), 2008, **33**; 266-306
- Kuboi R, Yoshimoto M, Walde P, Luisi PL, Refolding of carbonic anhydrase assisted by 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes, *Biotechnol. Progr.*, 1997, **13**; 826-836
- Leyboldt JK, Schmidt B, Gurland HJ.:Measurement of backfiltration rates during hemodialysis with highly permeable membranes.*Blood Purif.* 1991;9(2):74-84
- Menayame MF, Umakoshi H, Shimanouchi T, Yoshimoto M, Kuboi R, Characterization and control of stimuli-induced membrane fusion of liposomes in the presence of proteins and stimuli responsive polymers, *Biochem. Eng. J.*, 2002, **12**; 7-19
- Menayame MF, Umakoshi H, Shimanouchi T, Yoshimoto M, Kuboi R, Evaluation of interaction between liposome membranes induced by the stimuli-responsive polymers and proteins, *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, **93**; 498-501
- Mineshima M, Ishimori I, Ishida K, et al : Effects of internal filtration on the solute removal efficiency of a dialyzer.*ASAIO J.* 2000 Jul-Aug;46(4):456-60
- Miyama H, Harumiya N, Mori Y, Tanzawa H,A new antithrombogenic heparinized polymer,*J Biomed Mater Res.* 1977 ,**11**:251-265.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T, Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress, effects of vitamin E-coated dialyzer, *Circulation*, 2000, **101**:1002–1006
- 峰島三千男, 他 : 内部濾過促進型血液透析器の有用性. 人工臓器,1999,**28**(1);127-133

- Mori Y, Nagaoka S, Takiuchi H, Kikuchi T, Noguchi N, Tanzawa H, Noishiki Y, A new antithrombogenic material with long polyethyleneoxide chains, *Trans. Am. Soc. Artif Intern Organs*. 1982, **28**:459-463.
- Nagami H, Umakoshi H, Shimanouchi T, Kuboi R, Variable SOD-like activity of liposome modified with Mn(II)-porphyrin derivative complex, *Biochem. Eng. J.*, 2004, **21**; 221-227
- Nagami H, Yoshimoto N, Umakoshi H, Shimanouchi T, Kuboi R, Liposome-assisted activity of superoxide dismutase under oxidative stress, *J. Biosci. Bioeng*, 2005, **99**; 423-428
- Peskin, A.V., Winterbourn, C.C., A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1), *Clinica Chimica Acta*, 2000, **293**; 157-166
- Ronco C, Brendolan A, Feriani M, et al :A new scintigraphic method to characterize ultrafiltration in hollow fiber dialyzers. *Kidney Int*. 1992 May;41(5):1383-93
- Ronco C, Orlandini G, Brendolan A, et al :Enhancement of convective transport by internal filtration in a modified experimental hemodialyzer: technical note. *Kidney Int*. 1998 Sep;54(3):979-85
- Ronco C, Brendolan A, Lupi A, et al: Effects of a reduced inner diameter of hollow fiber in hemodialyzers. *Kidney Int*. 2000. **58**:809-817
- Saruhashi M, Morita H, Tani T, Sasaki M, Biocompatibility of the newly developed modified regenerated cellulose. *J Artif Organs*, 1992, **21**:1025–1030
- Shimanouchi T, Morita S, Umakoshi H, Kuboi R., Stimuli-responsive separation of proteins using immobilized liposome chromatography, *J. Chromatogr. B*, 2000, **743**; 85-91

- Shimazu T, Ominato M, Toyama K, Yasuda T, Sato T, Maeba T, Owada S, Ishida M, Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane on neutrophil superoxide anion radical production, *Kidney Int. Suppl*, 2001, **78**; S137-143.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, 1985, **150**; 76-85
- 柴田 猛, 他 : Dialyzer の逆濾過を応用した β_2 -MG 除去の検討. 腎と透析, 1994, **36**; 17-21
- 社団法人日本透析医学会学術委員会 : 各種の血液浄化法の機能と適応 - 血液浄化器の性能評価法と機能分類. 透析会誌, 1996, **29**: 1231-1245.
- 菅谷博之 : ミクロ相分離による多孔性材料作製. 高分子, 2006, **56**, 66-69.
- Shang M, Matsuyama H, Maki T, Teramoto M, Lloyd DR: Effect of crystallization and liquid-liquid phase separation on phase-separation kinetics in poly(ethylene-co-vinyl alcohol)/glycerol solution, *J. Polym. Sci., Part B, Polym. Phys.*, 2003, **41**, 194-201.
- Shimada M, Unoki M, Inaba N, Tahara H, Shinohara I, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K, Effect of adsorbed protein on the adhesion behaviour of platelet to the microdomain surface of 2-hydroxyethyl methacrylate-styrene block copolymer, *Euro. Polym. J.*, 1983, **19**, 929-933
- 菅谷博之, 板垣一郎 : 人工腎臓用高分子多孔質膜の表面構造, 日本化学会コロイドおよび界面化学部会誌, 31, 8-13 (2006).
- 菅谷博之, 上野良之, 山田智子, 板垣一郎 : ハイパフォーマンス・メンブレンの構造と機能. 腎と透析 61 : 19-23 (2006).
- Tanaka Y, Akiyama H, Kuroda T, Jung G, Tanahashi K, Sugaya H, Utsumi J, Kawasaki H, Hirano H., A novel approach and protocol for discovering extremely low-abundance proteins in serum, *Proteomics*, 2006, **6**; 4845 - 4855

- Tanzawa H, Mori Y, Harumiya N, Miyama H, Hori M, Preparation and evaluation of a new athrombogenic heparinized hydrophilic polymer for use in cardiovascular system, *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, 1973, **19**; 188-194
- Tuan LQ, Umakoshi H, Shimanouchi T, Kuboi R, Liposome-recruited activity of oxidized and fragmented superoxide dismutase, *Langmuir*, 2008, **24** ; 350-354
- Tuan LQ, Umakoshi H, Shimanouchi T, Kuboi R., Liposome can act as molecular and metal chaperone for oxidized and fragmented superoxide dismutase, *Enzym. Microb. Technol*, 2008, **44**; 101-106
- Tuan LQ, Umakoshi H, Shimanouchi T, Kuboi R., Characterization of oxidized and fragmented superoxide dismutase recruited on liposome surface, *Membrane*, 2008, **33**; 173-179
- Umakoshi H, Morimoto K, Ohama Y, Nagami H, Shimanouchi T, Kuboi R, Liposome modified with Mn-porphyrin complex can simultaneously induce antioxidative enzymes-like activity of both superoxide dismutase and peroxidase, *Langmuir*, **24**, 4451-4455 (2008)
- Umakoshi H, Yoshimoto N, Yoshimoto M, Shimanouchi T, Kuboi R., Liposome-assisted refolding of microbial transglutaminase, *Membrane*, 2007, **32**; 287-293
- Umakoshi H, Yoshimoto M, Shimanouchi T, Kuboi R, Komazawa I., Model system for heat-induced translocation of cytoplasmic β -galactosidase across phospholipid bilayer membrane, *Biotechnol. Progr.*, 1998, **14**; 218-226
- Wratten, M.L., Navino, C., Tetta, C., Verzetti, G., Hemolipodialysis, *Blood Purification*, 1999, **17** :127-133
- Yamahara K, Ota H, Kuboi R, Characterization of stress responsive behaviors of proteins, *J. Chem. Eng. Japan*, 1998, **31**; 795-803

- 山下明泰：逆濾過・逆拡散 血液透析スタッフのための新しいハイパフォーマンスダイ
アライザー，竹沢真吾編，1998,pp230-246，東京医学社，東京
- Yamamoto, K, Kobayashi, K., Endo, K., Miyasaka, T., Mochizuki, S., Kohori, F., Sakai,
K., Hollow-fiber blood-dialysis membranes: superoxide generation, permeation,
and dismutation measured by chemiluminescence, *J Artif Organs*, 2005, **8**:257-262
- Yang Q, Liu X-Y, Yoshimoto M, Kuboi R, Miyake J., Covalent immobilization of
unilamellar liposomes in gel beads for chromatography, *Anal. Biochem*, 1999, **268**: 354-362
- Yang Q. Lundahl P., Steric immobilization of liposomes in chromatographic gel beads
and incorporation of integral membrane proteins into their lipid bilayers, *Anal.
Biochem.*, 1994, **218**; 210-221
- Yang Q, Liu X-Y, Ajiki S-I, Hara M, Lundahl P, Miyake J., Avidin-biotin
immobilization of unilamellar liposomes in gel beads for chromatographic analysis
of drug-membrane partitioning, *J. Chromatogr. B*, 1998, **707**; 131-141
- Yokozawa T, Fujioka K, Oura H ,Increase in kidney 8-hydroxydeoxyguanosine level
with the progression of renal failure,*Nephron*, 1992,**61**;236-237
- Yoshimoto M, Kuboi R., Oxidative refolding of denatured/reduced Lysozyme utilizing
the chaperone-like function of liposomes and immobilized liposome
chromatography, *Biotechnol. Progr.*, 1999, **15**; 480-487
- Yoshimoto M, Walde P, Umakoshi H, Kuboi R., Conformationally changed cytochrome c
- induced fusion of enzyme- and substrate-containing liposomes, *Biotechnol.
Progr.*, 1999, **15**; 689-696
- Yoshimoto N, Tasaki M, Shimanouchi T, Umakoshi H, Kuboi R, Oxidation of cholesterol
catalyzed by amyloid β -peptide-Cu complex on lipid membrane, *J. Biosci.
Bioeng.*, 2005, **100**; 455-459

オリジナル論文リスト

(1) 原著論文：

1. M. Arakawa, I. Aoike, Y. Suzuki, F. Gejyo, R. Terada, H. Sugaya, T. Takeyama, and T. Kunitomo, Antithrombogenicity of polyacrylonitrile-polyethyleneoxide hollow fiber membrane developed for designing an antithrombogenic continuous ultrafiltration system. *Artif. Organs*, **16(2)**, 146-50(1992)
2. 寺田 良蔵, 菅谷 博之, 田中 和実, 酒井 良忠, 三永 昌弘, 國友 哲之輔, 武山 高之, 青池 郁夫, 鈴木 靖, 長尾 政之助, 下条 文武, 荒川 正昭, 鈴木 正司, 平沢 由平: 抗血栓性緩徐徐水システム(ACUS)設計のために開発したPAN-PEO中空糸膜の抗血栓性, *人工臓器*, **21(3)**, 1002-1006(1992)
3. Y. Tanaka, H. Akiyama, T. Kuroda, G. Jung, K. Tanahashi, H. Sugaya, J. Utsumi, H. Kawasaki, and H. Hirano, A novel approach and protocol for discovering extremely low-abundance proteins in serum, *Proteomics*, **6**, 4845-4855(2006)
4. H. Sugaya, H. Umakoshi, Y. Tohtake, E. Oyama, T. Shimanouchi, and R. Kuboi, Preparation of hollow fiber immobilized liposome membrane, *Membrane (Maku)*, submitted
5. 菅谷 博之, 峰島三千男: 内部濾過促進型ダイアライザーの設計と可能性, *腎と透析*, **51**,40-43 (2001)
6. H. Sugaya, H. Umakoshi, Y. Tohtake, T. Shimanouchi, and R. Kuboi, Characterization of hollow fiber immobilized liposome membrane by using aqueous two-phase partitioning systems, *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, submitted
7. 菅谷 博之, 遠武 佑治, 馬越 大, 久保井 亮一, 近藤 科江, 宮田 完二郎, 片岡 一則, バイオインターフェースの医療応用.表面科学, submitted
8. H. Sugaya, H. Umakoshi, K. B. M. A. Fadzil, L. Q. Tuan, T. Shimanouchi, and R. Kuboi, Preparation of superoxide dismutase LIPOzyme in the hollow fiber membrane, *Biochem. Eng. J*, submitted

(2) 関連論文：

1. H. Sugaya, Y. Sakai, Polymethylmethacrylate: from polymer to dialyzer, *Contrib. Nephrol.* , **125**, 1-8 (1999)
2. Y. Sakai, H. Shoji, T. Kobayashi, R. Terada, H. Sugaya, M. Murakami, K. Moriyama, M. Minaga, T. Kunitomo, T. Takeyama, New extracorporeal blood purification devices for critical care medicine under development. *Therapeutic Plasmapheresis*, **XII**, 837-842 (1993)
3. 小林 拓一, 寺田 良蔵, 菅谷 博之, 國友 哲之輔, 抗血栓性材料を用いた血液浄化システムの開発, *膜*, **19(6)**, 376-381 (1994)
4. 菅谷 博之, 棚橋 一裕, 山田 智子, 板垣 一郎, 分離膜を用いた生体成分分離デバイス, *分離技術*, **38(1)**, 42-47 (2008)
5. 菅谷 博之, 有効長を長くした内部ろ過促進型ダイアライザの性能. *臨床透析*, **18(4)**, 403-408 (2002)
6. M. Yamaguchi, H. Sugaya, T. Katayama, Hydrodynamic behavior of dispersed phase in a spray column with an electric field for liquid-liquid extraction, *J. Chem. Eng. Japan*, **21(1)**,179-183 (1988)
7. M. Yamaguchi, H. Sugaya, T. Katayama, Liquid-liquid extraction characteristics of a spray column with a D.C. electric field, *J. Chem. Eng. Japan*, **22(1)**, 25-29(1989)
8. 菅谷 博之, 板垣 一郎, 人工腎臓用高分子多孔質の表面構造, *日本化学会ニュースレター*, **31(3)**, 8-13 (2006)
9. 菅谷 博之, ミクロ相分離による多孔性材料作製, *高分子*, **56(2)**, 66-69 (2007)

10. 内海 潤, 菅谷 博之, 秋山 英雄, 藤井 清永, 進化する臨床プロテオミクス研究－実用化への課題と新規ツールの開発－, *バイオサイエンスとインダストリー*, **63(2)**, 25-29(2005)
11. 内海 潤, 菅谷 博之, 棚橋 一裕, 鄭 基晩, 秋山 英雄, 高性能タンパク質分画デバイスの開発－臨床プロテオミクス実用化のための新規ツール－, *バイオインダストリー*, **23(2)**, 54-61(2006)
12. 中島 秀和, 松本 宏, 小澤 英俊, 菅谷 博之, 松本 忠之, 牧尾 健司, 三軒 久義, ヘッダー室血液流れに着目した残血改善, *腎と透析*, **47**, 200-203 (1999)
13. 山田 智子, 菅谷 博之, 青池 郁夫, 大林 弘明, 鈴木 正司, 山岸 剛, 熊谷 誠, 岡田 雅美, 島田 久基, 中川 洋一, 響田 達也, 下条 文武, 痒みを有する透析患者に存在する肥満細胞脱顆粒因子の分離と透析膜による除去, *腎と透析*, **55**, 167-171 (2003)
14. 菅谷 博之, 山田 智子, 青池 郁夫, 大林 弘明, 鈴木 正司, 山岸 剛, 熊谷 誠, 岡田 雅美, 島田 久基, 中川 洋一, 響田 達也, 下条 文武, 痒みを有する透析患者に存在する肥満細胞脱顆粒因子の分離と透析膜による除去, *日本血液浄化技術研究会誌*, **11(1)**, 45-50 (2004)
15. M. Hayama, K. Yamamoto, F. Kohori, T. Uesaka, Y. Ueno, H. Sugaya, S. Itagaki, K. Sakai, Nanoscopic behavior of polyvinylpyrrolidone particles on polysulfone/polyvinylpyrrolidone film. *Biomaterials*, **25(6)**, 1019-1028 (2004)
16. 菅谷 博之, 山田 智子, 上野 良之, 板垣 一郎, ハイパフォーマンス・メンブレンの構造と機能, *腎と透析*, **61**, 19-23 (2006)
17. 菅谷 博之, 山田 智子, 上野 良之, 板垣 一郎, 吸着特性を生かした新規 PMMA 膜ダイアライザーの開発, *腎と透析*, **63**, 11-15 (2007)
18. Kien Xuan Ngo, Hiroshi Umakoshi, Toshinori Shimanouchi, Hiroyuki Sugaya, Ryoich Kuboi, Preparation and Characterization of Chitosanase-LIPOzyme Utilizing Cell Membrane-Liposome Interaction under Heat Stress, *Biotechnol. Bioeng.*, submitted

国際学会発表：

1. H. Sugaya, K. Tanaka, R. Terada, M. Minaga, H. Kataoka, T. Kobayashi, T. Kunitomo, T. Takeyama, Surface structure and blood compatibility of polyacrylonitrile(PAN)-polyethyleneoxide (PEO) hollow fiber membrane for developing antithrombogenic continuous ultrafiltration system(ACUS), *Proc. of 9th Annu. Meeting Int'l Soc. Blood Purification*, June 14th-16th, Nagoya (1991)
2. I. Aoike, M. Suzuki, S. Yamada, H. Sugaya, I. Itagaki, T. Ono, F. Gejyo, Proteomic analysis of mast cell stimulatory components in uremic pruritus patient plasma with a novel pretreatment device, *Proc. of 38th Annual Am. Soc. Nephrology Renal Week*, November 8th-13th, Philadelphia, USA (2005)
3. G. Jung, T. Kuroda, Y. Tanaka, H. Akiyama, K. Tanahashi, H. Sugaya, J. Utsumi, H. Kawasaki, and H. Hirano, A novel device for discovering extremely low abundant protein biomarkers in human serum, *Proc. of HUPO 4TH Ann. World Congress*, August 28th-September 1st, Munich, Germany (2005)
4. H. Sugaya, Y. Ueno, I. Itagaki; Oxidated LDL adsorption of newly developed polymer membrane, *Proc. of JSPS-SNSF Int'l Seminar on "Membranomics: Basic and Applied Aspect of Biomembrane and Its Mimics"(MSB-6)*, September 1st-3rd, Toyonaka, Osaka (2008)
5. R. Kuboi, H. Umakoshi, H. Sugaya, Y. Tohtake, M. Yoshimoto, N. Yoshimoto, T. Shimanouchi, Immobilized liposome chromatography /bio-membrane module for bioseparation and bioreactor, *Proc. of 8th Int'l Conf. on Separation Sci. Technol.*, Karuizawa, October 2nd-4th, Karuizawa, Nagano (2008)

謝辞

本研究を遂行するにあたり，常に温かく御指導頂きました大阪大学大学院基礎工学研究科 久保井亮一教授に深くお礼申し上げます。また，お忙しい中，ご指導とご助言を頂きました同研究科 馬越大准教授に深く感謝申し上げます。また，数々の助言を頂きました同研究科 島内寿徳助教に感謝申し上げます。本論文の作成にあたり，有益なるご助言とご校閲を賜りました大阪大学大学院基礎工学研究科 北山辰樹教授，實川浩一郎教授に深謝いたします。

人工腎臓の研究においては，東レ株式会社にて多大なご指導，ご助言をいただきました武山高之氏，國友哲之輔氏，谷口孝氏，三永昌弘氏，酒井良忠氏，寺田良蔵氏，田中和実氏の諸先輩方に厚くお礼申し上げます。また，抗血栓性人工腎臓システムプロジェクトをはじめ，長年にわたり人工腎臓の開発において多大なご指導とご助言をいただきました荒川正昭先生，平沢由平先生，下条文武先生，鈴木正司先生，青池郁夫先生，鈴木靖先生，長尾政之助先生，人工腎臓設計の大先輩としてご指導いただきました東京女子医科大学 峯島三千男教授に深く感謝申し上げます。

タンパク質分画デバイスのプロジェクトに関して多大なご協力，ご指導をいただきました横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 平野久教授，川崎博史准教授，また，プロジェクト立ち上げからご指導とご助言をいただきました東レ株式会社内海潤氏(現北海道大学教授)。さらに，プロジェクトを共に遂行いたしました東レ株式会社棚橋一裕氏，鄭基晩氏，和田茂久氏，伊藤明彦氏，秋山英雄氏，黒田俊彦氏，田中祥徳氏に深く感謝いたします。

さらに，大阪大学大学院基礎工学研究科久保井研究室にてリポソーム固定化膜の実験を共に行いました共同研究者の遠武佑治氏をはじめとした，研究室の Dr. Le Quoc Tuan 氏，Kien Xan Ngo 氏，Bui Thi Huong 氏，Vu Thi Huong 氏，石井治之氏，西田真人氏，西山圭一氏，松本匡晴氏，森本研吾氏，大山恵奈氏，嶋内直哉氏，菅恵嗣氏，大西諒氏，田部智之氏，民安志帆氏，山田真也氏，KHADIJAH BINTI MAHMAD FADZIL 氏に感謝申し上げます。

最後に，現在東レ株式会社にてご指導いただいております機能材料研究所 井上俊英所長，同研究所医療システム研究室 板垣一郎室長，また同研究室にて日々共に研究に取り組んでいます山田智子氏，上野良之氏，長部真博氏，荒木美帆氏，野坂史郎氏，藤田雅規氏はじめ，諸先輩方，同僚，友人，家族にあらためて深く感謝の意を表します。

