



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/23497">https://hdl.handle.net/11094/23497</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【104】

氏名	菅 谷 博 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 2 2 9 9 5 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学位論文名	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
論文審査委員	(主査) 教 授 久保井亮一  (副査) 教 授 北山 辰樹 教 授 實川浩一郎 准教授 馬越 大

## 論文内容の要旨

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/ペプチドなどの生物物質と相互作用し、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、リポソーム固定化中空糸膜(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 3 q 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てい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膜人工腎臓(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 9.8%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( $\rho$ 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 $\beta_2$ -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、リポソームを固定化した中空糸膜デバイス(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。

## 論文審査の結果の要旨

現在の血液透析治療では、物質の大きさによる分離膜の透過性の差によって尿毒物質を除去しているが、除去できる物質は一部であるうに、本来必要な有用成分をも選別されずに取り除いてしまう。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が酸化ストレスなどのストレスを与えるという問題がある。このため、長期には関節にタンパク質が蓄積したり、心血管合併症などの副作用を起こしやすいのが現状で

ある。

本学位論文では、血液透析治療で用いる人工腎臓の除去機能に生体内環境の修復機能を有する生体膜機能を付加することを目的とし、その達成手段として、リボソームを固定化した中空糸膜の創成と機能評価が検討された。最終的な目的は、患者の透析ストレスなどの副作用を低減するとともに、病態の進行抑制を目指すものである。第1章では、既存人工腎臓の課題を具体的に抽出するために、抗凝固性の中空糸膜モジュールシステムの創製および、透析患者の血液のプロテオーム解析が検討されている。ストレスを負荷すると、体内凝固調節機能の極端な低下が誘導されること、透析患者の血液は非常に多くのタンパク質が切断・変性されており、高いストレス負荷状態にある事が明らかにされ、これらの結果から、次世代型デバイスには、Build-Up型人工膜材料設計手法に併せて、モデル生体膜(リボソーム)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ている。第2章では親水性ポリマーの構造解析とリボソーム固定化デバイス設計に向けた基礎検討が検討されている。ポリビニルピロリドン (PVP) の内部にも動きが大きいとされる水が存在しており、各種タンパク質の吸着をPVPを含む親水化表面では飛躍的に抑制できることが示されている。また、リボソームを膜に充填したモジュールを作成して、人工腎臓としては十分な濾過機能を維持しており、SOD様活性などのリボソームが有する機能を付加することが可能であることを確認している。第3章では、リボ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、リボソームを分離膜の中に内包したリボソーム固定化膜人工腎臓 (ILM-AK) の創製が試みられている。固定化のために、リボソームをマトリックスゲルに内包させることを考案し、(i)リボソームを高濃度で固定可能であり、(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示されている。第4章では、ILM-AKの次世代型新規人工腎臓機能としての評価が検討された。ここで、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)を示すことが確認されて。また、本人工腎臓の新規な特長を評価するために、メンブレンチップを用いたMembraneome解析によりストレス状態の変化を調べ、ILM-AKにて体液のストレス状態を抑制できる可能性が示唆されている。

以上の様に、本学位論文では、腎不全患者の治療として用いられている新規な人工腎臓を志向するデバイスとして、リボソームを固定化した中空糸膜デバイスの創成が示されている。このデバイスは、リボ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ストレスを低減する機能を付加しており、新規な価値(機能)を惹起できる点で画期的であり、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が示されている。よって、博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。