Monitoring of Hemodialysis by Urea Sensor

尿素センサによる人工腎臓のモニタリング

Masaya SETO, Mitsuo SAITOH, Noriaki KITAMURA,
Kouji SHIMAZAKI, Sachio SUGIURA, Kentaro YODA

Department of Bio-Medical Engineering, Tokai University
317 Nishino, Numazu, Shizuoka, 410-03 JAPAN
TEL.0559-68-1111 ex.4529

(Received 17, November 1994 Accepted 24, March 1995)

ABSTRACT

An urea sensor was developed for the determination of urea in dialysate of hemodialysis. The urea sensor was constructed by combining an immobilized enzyme urease membrane with an ammonia electrode. The sensor responded to urea in concentration over 1-100 mg/dl. The sensor is useful for the determination of urea clearance of dialyzer. The sensor can also provide a new laborsaving procedure for the estimation of blood urea concentration by measuring urea concentration in outlet dialysate during hemodialysis treatment.

Key words: urea sensor, urease, ammonia electrode, hemodialysis, dialyzer clearance

1. はじめに

人工腎臓による血液透析療法は最も普及率の高い人工臓器療法であり、我国の慢性透析患者数は13万人にも達している。しかし、現在の血液透析は透析液組成、透析液流量、血液流量および透析時間が画一的であり、各患者に対して最適な療法とはなっていない。そこで、個々の患者の病態に合わせた血液透析を行うために、除水量および血中溶質濃度を測定して最適化を計る試みがあり、除水量に関しては除水コントローラーが開発されている。血中溶質濃度の測定については安全性と患者への負担の点から困難が多いため、代わりに透析液廃液中の除去溶質濃度を測定して数値モデル¹を用いて血中溶質濃度を推算して透析終了時間を決定する方式が提案され、透析により除去される代表的な老廃物である尿素についての研究が報告されている^{2,3}。一方、透析器の製造においても、性能の指標として尿素クリアランス、ふるい係数などが用いられ、尿素的測定が行われている。

本研究においては、血液透析時に透析終了時間を決定したり、透析器の評価指標としての尿素クリアラン

スを求めるために、試料の希釈や濃縮といった煩雑な操作なしに簡便で精度の高い尿素測定を可能とする新しい尿素センサを開発し、透析器の尿素クリアランスの測定および透析液廃液中の尿素測定への尿素センサの応用について検討した。

オンライン計測に適した尿素検出用バイオセンサとして、固定化ウレアーゼとアンモニア電極、二酸化炭素電極またはアンモニウムイオン電極とを組み合わせたセンサなどが試作されている。これらのうち、アンモニア電極を用いるものが、 Na^+ 、 K^+ 、炭酸ガスなどの妨害がなく、生体試料の測定に適している。固定化ウレアーゼとアンモニア電極とを組み合わせた酵素電極に関しては、アンモニア電極の外側にテフロン膜で酵素溶液を保持した型⁴、アンモニア電極のガス透過膜上に酵素溶液を直接固定化した型⁵、多孔性テフロン膜に酵素溶液を含浸固定化した膜をアンモニア電極の外側に設置した型⁶、などが検討されているが、再現性良く均質なセンサを作製することが難しいなどの問題点が多いために実用化されていない。

本報告では、容易に入手出来る均質な材料を用いた

作製の再現性が良く、均質で実用的尿素センサとして、基質透過性に優れたポリカーボネート多孔性膜とアンモニアガス透過性に優れたポリテトラフルオロエチレン膜との間にウレアーゼをグルタルアルデヒド架橋法により固定化した複合膜とアンモニウムイオン検出用ガラス電極とを組み合わせた酵素電極を試作し、人工腎臓のモニタリングについて検討した結果を報告する。

2. 実験

2.1 試薬等

ウレアーゼ (EC 3・5・1・5) は東洋紡製診断薬グレード、牛血清アルブミンはシグマ製結晶グレード、グルタルアルデヒドは和光純薬製電子顕微鏡用水溶液をそれぞれ使用した。その他の試薬は市販特級品をそのまま使用した。透析液は扶桑薬品製キンダリー液AF-2号を使用した。固定化酵素用の膜担体として、ニュクリポア製ニュクリポアメンブレン (孔径 $0.05\mu\text{m}$ 、材質ポリカーボネート)、アンモニアガス透過性膜は堀場製作所製アンモニア電極部品のポリテトラフルオロエチレン多孔性膜をそれぞれ使用した。

2.2 固定化ウレアーゼ膜の作成

1 mM の EDTA を含む 50 mM 磷酸カリウム緩衝溶液 pH 7.5 (以下 KPBS と略す) $150\mu\text{l}$ にウレアーゼ (14.9U/mg) 20mg 、牛血清アルブミン 10mg を溶解し、氷冷下で 5% グルタルアルデヒド水溶液 $100\mu\text{l}$ を加えて混合した。直ちに、水平に保持した $50\times 50\text{mm}^2$ のニュクリポアメンブレンに均一に流延した。4℃ で 20 分、室温で 10 分間放置してゲル化させた。次に、1 M のグリシンを含む 50 mM の KPBS に室温で 1 時間、4℃ で 19 時間浸漬して未反応のグルタルアルデヒドを処理した。KPBS で洗浄後、5% グリセリンを含む KPBS に

Fig.1. Schema of urea sensor.

Fig.2.Principle of urea analysis by urea sensor.

1 時間浸漬した。次いで、アンモニア電極用ポリテトラフルオロエチレン多孔性膜で酵素面を被覆後、4℃ にて風乾して固定化ウレアーゼ膜を得た。

2.3 尿素センサによる尿素的測定

固定化ウレアーゼ膜とアンモニア電極用 pH 電極とを組み合わせ作成した尿素センサの模式図を Fig.1 に示した。測定原理を Fig.2 に示したが、ポリカーボネート多孔性膜を透過した試料中の尿素はウレアーゼの作用により加水分解されてアンモニアを生成する。生成したアンモニアはアンモニアガス透過性膜を通過して電極内部液 (塩化アンモニウム水溶液) に溶解し、pH 感応性ガラス電極によって検知される。

透析液に一定量の尿素を溶解した尿素標準液および試料中の尿素的測定は希釈することなしに、ビーカーに入れた試料にイオンメーターに接続した尿素センサを直接浸してバッチ法で行った。アンモニア電極用の pH 電極は堀場製作所製 5002A-06T 型、イオンメーターは堀場製作所製 N-8M 型、記録計は日本電子科学製ユニコーダー U-228 型をそれぞれ使用した。

Fig.3. Schematic diagram of clearance test set-up.

2.4 尿素クリアランスの測定

透析器の尿素クリアランスの測定は日本人工臓器学会のダイアライザー性能評価基準⁷を参考にしてFig.3に示した回路構成とし、以下の実験条件で実施した。

モデル血液（B液）および透析液（D液）の流れは向流とし、透析器への供給はシングルパスとした。B液、D液の温度を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ にコントロールし、B液流量（QBi）とD液流量（QDi）はそれぞれ $200 \text{ ml/min} (\pm 2\%)$ と $500 \pm 10 \text{ ml/min}$ とした。膜間圧差TMPは $0 \pm 10 \text{ mmHg}$ とした。サンプリング場所はB液回路およびD液回路の透析器出口とし、回路内の流量が一定になった後に 20 ml ずつサンプリングした。透析器はニプロの中空糸型 110 M （限外濾過率 6.8 ml/mmHg/hr 、尿素クリアランス 173 ml/min ）を使用した。モデル血液には尿素を一定量含む水溶液を用いた。試料中の尿素濃度は尿素センサにより測定した出力電位差の値から濃度既知の標準液について求めた検量線を用いて算出した。

透析器に導入された血液中から透析膜を通過して透析液側に除去される尿素的除去効率は次式で定義される尿素クリアランス（CL）によって評価される。

$$CL = (C_{Bi}Q_{Bi} - C_{Bo}Q_{Bo}) / C_{Bi}$$

ただし、 C_{Bi} ：透析器入口側血中尿素濃度、 C_{Bo} ：透析器出口側血中尿素濃度、 Q_{Bi} ：供給血液流量、 Q_{Bo} ：流出血液流量である。測定値を上式に代入して透析器の尿素クリアランスを求めた。尿素クリアランスは透析器内に導入された血流量のうち、着目する尿素濃度が計算上ゼロとなる流量を意味する。

3. 結果

3.1 尿素センサによる尿素的測定

透析液に一定量の尿素を溶解した標準試料中の尿素濃度に対する尿素センサの出力電位差をプロットした結果をFig.4に示した。透析液およびモデル血液中の尿素が $1 \sim 100 \text{ mg/dl}$ の範囲で測定できた。

3.2 透析器の尿素クリアランスの評価

各時間毎にサンプリングしたB液およびD液について測定した尿素センサの出力電位差からFig.4の検量線を用いて算出した尿素濃度値をTable 1に示した。8分および12分の値の平均値から実験に用いた透析器の尿素クリアランスを求めた結果、 172 ml/min が得られた。この値はメーカーがウレアーゼ・インドフェノール法に基づく比色法によって求めた値 173 ml/min とほぼ一致した。

4. 考察

Figure4の結果から、尿素センサによる尿素的測定は $1 \sim 100 \text{ mg/dl}$ の濃度範囲をカバーすることが可能である。患者体内から動脈血を導き出して人工膜を介して透析液と接触させて血液中の尿素などの老廃

Fig.4. Standard curve for urea analysis.

Table 1. Experimental data on clearance measurement of dialyzer.

Dialysis time (min)	Pressure(mmHg)			
	PDi	PDo	PBi	PBo
8	18	10	25	2
12	15	11	25	2

Urea concentration(mg/dl)			
C _{Di}	C _{Do}	C _{Bi}	C _{Bo}
0	26	100	14
0	23	100	14

物を拡散により除去して静脈に戻す透析療法においては、1回の血液透析で除去される尿素的量は $12 \sim 30 \text{ g}$ であり、使用する透析液量は $150 \sim 300 \text{ l}$ であるから、透析液中の尿素濃度としては $0 \sim 20 \text{ mg/dl}$ 程度である。したがって、尿素センサでは希釈することなしに透析液中の尿素を測定することができる。

本実験の結果から算出された透析器の尿素クリアランスの値とメーカーが測定したウレアーゼ・インドフェノール法による尿素クリアランスの値が一致したことにより、簡便な尿素センサ法が操作の煩雑な比色法に代って、製造工程における透析器の性能評価に利用できることが明らかになった。

従来、オンラインで透析液廃液中の尿素濃度を簡単に測定できなかったが、尿素センサを利用することによりオンライン化が容易となり、個々の患者に最適な透析を実施できる可能性がある。必要透析時間を推定するために、人体を1つのタンクとして考える1プー

ルモデル⁸を適用する。透析器の尿素クリアランスをCL、透析開始t分後の透析液廃液中の尿素濃度および血中尿素濃度をそれぞれCD(t)およびCB(t)、透析液流量をQDとして、透析中の除水を無視した場合、1プールモデルではCB(t)は次式となる。

$$CB(t) = CD(t) \times QD / CL$$

したがって、実験的に求めたCD(t)、QDおよびCLの値から血中尿素濃度を推定することができ、必要透析時間の推定が可能となり、採血して血中尿素濃度を測定する必要がない。これにより、患者に必要なして十分な透析を実施することができる。

実際に尿素センサを透析システムに組み込むためには、電極の校正や洗浄についての詳細な検討が必要であると考えられる。

References

1. J.A.Sargent, F.A.Gotch, *Kidney Int.*, **18**, S2 (1980)
2. J.Kamisina, et al, *Jpn. J. Artif. Organs*, **13**, 735(1984)
3. R.Lindsay, et al, *ASAIO Abstract*(1993)p.90
4. D.S.Papastathopoulos, G.A.Rechnitz, *Anal. Chem. Acta*, **79**, 17(1975)
5. M.Mascini, G.G.Guilbault, *Anal. Chem.*, **49**, 795(1977)
6. M.Hatou, et al, *J. Chem. Soc. of Japan*, **1981**, 1172(1981)
7. *The Standard for Evaluation of Dialyser*, Ed by Jpn. Society for Artif. Organs, Tokyo(1982)
8. K.Sakai, *Fundamentals of Blood purification for Dialysis Stuff*, IPC Publisher, Tokyo(1989) p.50

'94 SAS Intelligent Symposium