Interferon α -2b の各種透析膜への *in vitro* 吸着試験吉澤 英子 越智 文美 加瀬 公一郎 横山 裕彰
岩田 次郎*

シェリング・プラウ(株) 済生会松阪総合病院内科*

key words: 透析膜, interferon, 吸着

〈要旨〉

透析患者の慢性C型肝炎に対する interferon α -2b (以下 IFN) 療法の薬物動態の結果から, IFN が透析により除去されることを報告した。今回, 透析膜の IFN 除去作用のうち吸着に注目し, 各種透析膜に対する IFN の吸着特性を比較した。透析膜には, 再生セルロース膜 (RC) である TFU 10H と AM-FP-15, セルローストリアセテート膜 (CTA) である FB-130U_{GA}, ポリメチルメタクリレート膜 (PMMA) である B1-1.3H およびポリアクリロニトリル膜 (PAN) である PAN-13DX の4素材, 計5種類を用いた。細断した透析膜を IFN を含むブドウ糖液中に添加し, 溶液中の IFN 力価を経時的に測定したところ, FB-130U_{GA}, AM-FP-15, PAN-13DX および B1-1.3H はいずれも膜試料添加後5~10分で速やかに IFN 力価が低下し, 60分後にはそれぞれ10.9%, 55.0%, 65.8%, 91.4%の低下が認められ, 透析膜への IFN の吸着性は B1-1.3H > PAN-13DX > AM-FP-15 > FB-130U_{GA} の順に高く, TFU 10H では吸着を認めないことがわかった。また, ブドウ糖液中における IFN の透析膜への吸着性は, 膜素材の疎水性および膜構造が大きく関与していると考えられた。

Adsorption of interferon α -2b to dialysis membranes in an *in vitro* study

Eiko Yoshizawa, Ayami Ochi, Koichiro Kase, Hiroaki Yokoyama, Jiro Iwata*

Schering-Plough K. K.; Department of Internal Medicine, Saiseikai Matsusaka General Hospital*

It has been reported that hemodialysis procedures reduce the serum concentration of interferon α -2b (IFN) administered to hemodialysis patients with chronic hepatitis C. In this study we examined the possible adsorption of IFN to dialysis membranes. We tested five dialysis membranes made with four different materials: TFU 10H and AM-FP-15 with regenerated cellulose membranes (RC), FB-130U_{GA} with a cellulose-triacetate membrane (CTA), B1-1.3H with a polymethylmethacrylate membrane (PMMA) and PAN-13DX with a polyacrylonitrile membrane (PAN). The dialysis membranes were shredded, immersed and stirred in an IFN solution containing 5% glucose, and the residual IFN titer in the solution was measured. Under these experimental conditions, the IFN titers of FB-130U_{GA}, AM-FP-15, PAN-13DX and B1-1.3H declined rapidly in from 5 to 10 min in all membranes. At 60 min they had decreased by 10.9%, 55.0%, 65.8% and 91.4%, respectively. The adsorption rate of IFN was higher in the order of B1-1.3H > PAN-13DX > AM-FP-15 > FB-130U_{GA}, and IFN was not adsorbed to TFU 10H. The rate of adsorption of IFN to dialysis membranes in the IFN solution containing 5% glucose seemed to be influenced by the hydrophobic property and structural characteristics of the membrane.

緒 言

近年, 溶質除去性能の向上を目的に, 高機能膜, 高性能膜と呼ばれる中空糸膜が多数開発され, 膜素材としてセルロース系膜や合成高分子膜が透析療法に用い

られている。透析患者への薬剤投与の機会が増加し, 腎排泄型の薬剤が投与される場合には体内への薬物の蓄積を防ぐために薬物を体内から除去する必要がある。透析時における薬剤の除去作用には透析膜による拡散, ろ過および吸着がある。第36回日本腎臓学会総会で透析患者における IFN の薬物動態の検討につい

て報告したが、透析時に IFN を投与した場合の血中濃度推移は非透析時に投与した場合に比べ低い値を示したことから、IFN が透析により除去されていることが示唆された。また、透析液中に IFN が検出されなかったことから、透析膜からのろ過による除去の可能性は少ないと考えられた。そこで、除去作用のうち吸着に注目し、*in vitro* における基礎的な IFN の吸着試験^{1,2)}を実施した。

I. 方 法

1. IFN 溶液の調製

IFN 溶液は IFN 1000 万 I. U. を 5%ブドウ糖液 500 ml に溶かし調製した。

2. 膜試料の作成

試験に用いた 5 種類の透析膜を表 1 に示した。各種透析膜を生理食塩水で洗浄し、透析膜中に残存する生理食塩水を圧縮空気を取り除いた後、中空糸を取り出し、3 mm に細断したものを膜試料とした。

3. 吸着試験

1) 実験器具の選択

ガラス、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ステンレス、ポリメチルペンテンおよびテフロン[®]の 6 種類のビーカーに IFN 溶液 80 ml をとり、マグネティッ

クスターラーで 5 分間攪拌した後、溶液中の IFN 力価を測定した。

2) 吸着試験に使用する膜試料の添加量の検討

図 1 の装置を用い、ビーカー中に IFN 溶液 80 ml をとり、B1-1.3H および AM-FP-15 の膜試料 0.1 g、0.5 g および 2.5 g を加え、室温 (23°C ± 2) にてマグネティックスターラーで攪拌しながら、膜試料添加前、添加後 5 分および 60 分の溶液中の IFN 力価を測定した。

3) 吸着試験の再現性

図 1 の装置を用い、ビーカー中に IFN 溶液 80 ml をとり、表 1 に示した各種膜試料 0.5 g を加え、室温にてマグネティックスターラーで攪拌しながら、膜試料添加前、添加後 5 分の溶液中の IFN 力価を測定した。

4) 各種透析膜における吸着試験

図 1 の装置を用い、IFN 溶液 80 ml をビーカーにとり、表 1 に示した各種膜試料 0.5 g を加え、室温にてマグネティックスターラーで攪拌した。膜試料添加前、添加後 5, 10, 20, 30 分および 60 分の溶液中の IFN 力価を測定した。コントロールとして膜試料を加えない場合の IFN 力価を測定した。

5) IFN 力価測定法

IFN 力価は山崎の方法³⁾に従い、FL 細胞-Sindbis virus の系を用い、細胞変性抑制効果により力価を測定した。IFN 標準品として interferon α -2b 国内標準品 (ロット番号：QC # 080087, 7710 I. U.) を用いた。

II. 結 果

1. 実験器具の選択

本実験では IFN の実験器具への吸着を最小限に抑える必要があったので、研究室において一般によく用いられている 6 種類の実験器具素材について検討を行った。結果を表 2 に示したが、ガラスおよびポリプロピレンを素材とした容器では IFN 溶液中の力価がそれぞれ 10.0%, 9.6% 低下し、ポリメチルペンテン、ポリカーボネートおよびステンレスを素材とした容器では各々 16.1%, 17.3%, 17.7%, テフロンを素材と

図 1 Apparatus for adsorption experiment

表 1 Specification of dialyzer

Dialyzer	membrane material	Maker	Surface area (m ²)	Inner diameter (μm)	Wall thickness (μm)
B1-1.3H	Polymethylmethacrylate (PMMA)	TORAY	1.3	200	8
FB-130U _{GA}	Cellulose triacetate (CTA)	NISSHO	1.3	200	15
PAN-13DX	Polyacrylonitrile (PAN)	ASAHI MEDICAL	1.3	250	35
AM-FP-15	Regenerated cellulose (RC)	ASAHI MEDICAL	1.5	180	15
TFU 10H	Regenerated cellulose (RC)	TEIJIN	1.1	200	8

した容器では21.8%の低下を示した。IFNの吸着が最も少なかったのはガラスおよびポリプロピレンであった。以上の結果から、吸着試験ではガラス製の試験容器を用いたが、容器への吸着と考えられる測定時間の経過に伴うIFN力価の低下が認められた。試験容器へのIFN吸着により生じる測定値への影響を取り除くため、コントロールの減衰率で補正した各種透析膜のIFNの残存率を求め、さらに残存率から算出した吸着率でIFNの透析膜への吸着性を評価した。

2. 吸着試験に使用する膜試料の添加量の検討

今回用いた実験系において、IFNの透析膜への吸着性の差を検出するのに最も適した膜試料の使用量を求めるため、一般に蛋白を吸着しやすいといわれているPMMA (B1-1.3H) および吸着しにくいといわれているRC (AM-FP-15) を用いて検討した。それぞれの膜試料0.1 g, 0.5 g および2.5 gをIFN溶液中に添加した場合のIFN残存率の変化を図2に示した。膜試料0.1 g, 0.5 g および2.5 gを添加した場合の5分後および60分後のIFN残存率を比較すると、B1-1.3Hの5分後の残存率はそれぞれ49.8%, 38.2%, 8.3%であり、60分後の残存率はそれぞれ21.6%, 2.7%, 3.0%であった。また、AM-FP-15の5分後の残存率はそれ

ぞれ59.4%, 57.2%, 34.1%であり、60分後の残存率はそれぞれ22.3%, 9.7%, 4.1%であった。いずれの膜試料においても0.5 gを添加したとき、添加後5分と60分のIFN残存率に最も大きな差を認めた。

3. 吸着試験の再現性

各種透析膜について2回繰り返し吸着試験を行い、膜試料添加後5分の残存率を求めたところ、残存率の標準偏差は1.4~6.1%であった。良好な再現性が得られたことから、この実験系がIFNの透析膜への吸着性を確認するのに適当な方法であると判断した。

4. 各種透析膜における吸着試験

B1-1.3H, FB-130U_{GA}, PAN-13DX, AM-FP-15 およびTFU 10Hの5種類の透析膜について、膜試料0.5 gを添加したときのIFN力価の経時変化を表3に示した。いずれの膜素材の場合においてもIFNの力価は測定時間の経過に伴い低下し、膜試料を添加しなかったコントロールでも経時的な低下が認められたので、コントロールの減衰率で補正した各種透析膜のIFNの残存率を求めた(表3)。さらに、IFNの残存率から各種透析膜のIFNの吸着率を求め図3に示した。ただし、IFNの吸着率がマイナスとなる場合は0%として表示した。各種透析膜の膜試料添加後5, 10, 20, 30分および60分のIFN吸着率は、B1-1.3Hでは57.3%, 81.1%, 89.2%, 88.0%および91.4%を示し、PAN-13DXでは40.7%, 55.0%, 63.0%, 65.9%および65.8%, AM-FP-15では20.5%, 34.4%, 54.0%, 60.1%および55.0%, FB-130U_{GA}では18.0%, 18.0%, 22.8%, 26.0%および10.9%, TFU 10Hでは8.8%, 0%, 0%, 0%, 9.1%を示した。IFN吸着率の増加はB1-1.3Hで最も大きく、PAN-13DX>AM-FP-15>FB 10Hの順に小さくなり、TFUではIFN吸着率の変化をほとんど認めなかった。また、い

表2 Comparison of containers to the adsorption of IFN

Materials of container	Residual IFN (%)
Glass	90.0
Polypropylene	90.4
Polymethylpentene	83.9
Polycarbonate	82.7
Stainless steel	82.3
Copolymer of tetrafluoroethylene and perfluoroalkyl vinyl ether	78.2

図2 Effect of the weight of membrane materials on residual IFN of IFN solution

表 3 The adsorption of IFN to various dialysis membranes

		IFN activity (I. U./ml)						
	Dialyzer	Time (min)	0	5	10	20	30	60
Exp. 1	Control ¹⁾		15,900	12,300	10,500	7,220	5,700	3,890
	B1-1.3H		19,100(100) ²⁾	6,310(42.7)	2,390(18.9)	940(10.8)	830(12.0)	400(8.6)
Exp. 2	Control		17,800	13,300	12,300	9,490	7,000	5,300
	AM-FP-15		17,500(100)	10,400(79.5)	7,920(65.6)	4,290(46.0)	2,750(39.9)	2,340(45.0)
	PAN-13DX		17,600(100)	7,800(59.3)	5,480(45.0)	3,460(37.0)	2,360(34.1)	1,790(34.2)
Exp. 3	Control		21,200	17,200	11,800	9,010	6,610	4,670
	FB-130U _{GA}		19,700(100)	13,100(82.0)	9,000(82.0)	6,470(77.2)	4,550(74.0)	3,860(89.1)
	TFU10H		19,200(100)	14,200(91.2)	11,000(102.9)	8,630(105.6)	7,460(124.7)	3,840(90.9)

1) Tested without membrane

2) Residual IFN (%) = 100 (A/A₀) / (C/C₀),

where A : IFN activity of IFN solution with membrane

A₀ : Initial IFN activity of IFN solution with membrane

C : IFN activity of IFN solution without membrane

C₀ : Initial IFN activity of IFN solution without membrane

図 3 Time courses of adsorption of IFN to various dialysis membranes

1) Adsorption of IFN (%) = 100 - 100 (A/A₀) / (C/C₀),

where A : IFN activity of IFN solution with membrane

A₀ : Initial IFN activity of IFN solution with membrane

C : IFN activity of IFN solution without membrane

C₀ : Initial IFN activity of IFN solution without membrane

ずれの透析膜においても IFN は膜試料添加後 5～10 分に速やかに吸着し、膜試料添加後 30 分以降には吸着率がほぼ一定の値を示した。このことから、膜試料添加後 60 分の吸着率を用いて、透析膜 1g に吸着する IFN を算出した(表 4)。透析膜 1g に吸着する IFN 量は最も多い B1-1.3H で 281 万 I. U., PAN-13DX で 184 万 I. U., AM-FP-15 で 153 万 I. U. となり、最も少ない FB-130U_{GA} で 35 万 I. U. であった。

表 4 The estimate of adsorbed IFN to dialysis membrane

Dialyzer	membrane material	Adsorbed IFN ¹⁾ (I. U./g)
B1-1.3H	Polymethylmethacrylate (PMMA)	2,810,000
FB-130U _{GA}	Cellulose triacetate (CTA)	350,000
PAN-13DX	Polyacrylonitrile (PAN)	1,840,000
AM-FP-15	Regenerated cellulose (RC)	1,530,000
TFU10H	Regenerated cellulose (RC)	— ²⁾

1) Adsorbed IFN (I. U./g) = AV (1-X/100)/W,

where

A : IFN activity of IFN solution (I. U./ml)

V : Volume of IFN solution (ml)

X : Residual IFN (%)

W : Weight of membrane (g)

2) Not observed adsorption

III. 考 察

第 36 回日本腎臓学会総会で報告したように、IFN を透析中に点滴静注した際、点滴静注 2 時間後に透析膜の血液流入口および血液流出口の IFN 力価を測定したが、両者の血液中の IFN 力価にほとんど差は認められず、他施設と同様 *in vivo* における IFN の除去については確認できていない。しかしながら、透析患者における IFN の薬物動態の検討では、IFN を透析中に点滴静注した際非透析患者とほぼ同じ薬物動態を示し、非透析時に点滴静注した際の薬物動態と比べ C_{max} と AUC は減少し T_{1/2} は短縮した⁴⁾ことから、投与された IFN は透析により除去されていると考えられた。透析膜に β_2 -microglobulin、フィブリノーゲン、ホルモンなどの血液成分および抗凝固薬などの薬

剤が吸着するとの報告^{2,5-7)}があることから、IFN も透析膜への吸着により除去されているのではないかと推察された。そこで、*in vitro* において、5種類の透析膜に対するIFNの吸着性を検討した結果、IFNは4種類の透析膜に吸着することが確認され、透析患者に認められた透析時におけるIFNの薬物動態の変化の要因として、IFNの透析膜への吸着が考えられた。また、*in vitro* において、IFNの透析膜への吸着は速やかに生じ膜試料添加後30分にはほぼ平衡状態に達したことから、*in vivo* においても点滴静注2時間後にはすでに平衡状態に達しており、透析膜の血液流入口および血液流出口のIFN力価に差を認めなかったのではないかと考えられた。

今回、各種透析膜へのIFNの吸着性はTFU 10H < FB-130U_{GA} < AM-FP-15 < PAN-13DX < B1-1.3Hの順に高くなった。この結果は、蛋白質であるエリスロポエチンの吸着性がRC < CA (セルロースアセテート膜) < PANの順に高いという報告⁸⁾、 β_2 -microglobulinの吸着性がCA < PAN < PMMAあるいはRC < PAN < PMMAの順に高いという報告^{9,10)}、透析終了後に透析膜表面に付着している蛋白量がCA < RC < PMMAの順に多いという報告¹⁰⁾など、合成高分子膜は蛋白を吸着しやすくセルロース系の膜は蛋白を吸着しにくいという結果とよく一致した。一般に、膜への物質の吸着特性は膜と物質との親和性によるといわれており、透析膜の素材、表面構造および膜表面電位等と物質の物理的・化学的性質によると考えられている。今回検討した透析膜素材の ζ 電位はいずれの透析膜においても負を帯びている¹⁰⁻¹³⁾のに対し、IFN溶液のpHが6.9であり溶液中のIFNもわずかに負に帯電していることから、電気的な親和性による吸着は大きく関与していないと考えられた。一方、インシュリンのガラスアンプルへの吸着において、吸着のメカニズムはインシュリンとガラスとの疎水結合であり、溶液のpHがインシュリンの等電点(分子の見かけの電荷がゼロとなるpH)付近のときインシュリンの疎水性が高くなり、ガラスへの吸着性が最も高くなったという報告がある¹⁴⁾。透析膜のうち、RCは親水性膜、CTAは親水性部分と疎水性部分を有する膜、PANおよびPMMAは疎水性膜であることから、膜の疎水性はRC < CTA < PAN, PMMAの順に大きくなっていると考えられた。透析膜の疎水性とIFNの透析膜への吸着性とがほぼ一致すること、また、IFN溶液のpHがIFNの等電点(約6)付近でありIFNの疎水性が高くなっていると考えられることから、IFNの透析膜への吸着の要因として膜の疎水性が大きく関与している

と考えられた。ただし、AM-FP-15よりもFB-130U_{GA}でIFN吸着性が低いことや同じ疎水性膜であるPAN-13DXとB1-1.3Hとの間にIFN吸着性の差が認められたこと、膜の物理化学的構造が蛋白質の結晶化を促進し膜への吸着量を増加させているのではないかと報告⁸⁾などから、透析膜へのIFNの吸着の要因は膜の疎水性の他に膜表面の構造や膜内部の孔形状も関係していると推察された。

今回、我々はIFNの透析膜に対する吸着性を知る目的で、他の蛋白等を含まない実験系を採用し、*in vitro*での検討を行った結果、透析膜の種類によりIFNの吸着性が異なることを確認した。しかしながら、*in vivo*では、第36回日本腎臓学会総会で報告したように、透析時にIFNを点滴静注した場合の血中濃度は透析膜の種類が異なってもほぼ同じ推移を示し、今回の検討で見られるような透析膜の種類によるIFNの除去作用の差が認められていない。これは、チトクロームCの吸着により膜の特性が変化したとの報告¹³⁾、アルブミンの吸着によりエリスロポエチンの吸着量が減少したとの報告⁸⁾、血漿蛋白を含まない実験系の結果と臨床における透析膜の薬剤クリアランスに差を生じたとの報告¹⁵⁾などが示すように、IFNの透析膜への吸着もIFN以外の蛋白などの存在により影響を受けているためであると考えられた。従って、実際の臨床の場合におけるIFNの透析膜への吸着性を明らかにするためには、さらにアルブミンなどの血漿蛋白が存在する実験系で吸着試験を行い、今回実施した*in vitro*の結果と比較検討を行う必要があると考えられた。

結 論

今回、我々は細断した透析膜をIFNを含む5%ブドウ糖液中に添加し、*in vitro*においてIFNの吸着試験を実施した結果、透析膜へのIFNの吸着性はFB-130U_{GA} < AM-FP-15 < PAN-13DX < B1-1.3Hの順に高く、IFN初期濃度の10.9~91.4%の吸着を認めた。また、TFU 10Hにはほとんど吸着を認めなかった。

文 献

- 1) 中西裕治, 稲垣王子, 高光義博, 藤田嘉一: Polyacrylonitrile膜及びHemophan膜における薬剤吸着性について. 人工臓器 22: 88, 1993
- 2) 河田一郎: 各種膜素材による β_2 -microglobulinの吸着特性. 腎と透析 25: 59, 1988
- 3) 山崎修道: インターフェロンの測定方法と問題点. Pharma Medica 4: 111-118, 1986
- 4) 岩田次郎, 大西孝宏, 菅 孝明, 長谷川陽, 鍋島一雄,

- 浜田 実, 上野利通, 市川毅彦, 水谷安秀, 藤本昌雄, 村山 卓, 奥田喜朗, 為田鞆彦：透析患者のC型慢性肝炎に対するインターフェロン療法. 透析会誌 28：151-157, 1995
- 5) Chuang HYK, Sharpton TR, Mohammad SF：Adsorption and reactivity of human fibrinogen and immunoglobulin G on two types of hemodialysis membranes. Int J Artif Organs 6：199-206, 1983
- 6) 田島直人, 古賀 彰, 神田洋幸, 筑後和也, 中尾俊之, 高加国夫, 古川祐子：血液透析透析膜の高分子化合物吸着能 血糖調節ホルモンの透析膜に対する吸着性の検討. 日本臨牀 49 (増刊号)：185-189, 1991
- 7) 芝本 隆, 秋葉 隆：血液透析 透析膜の高分子化合物吸着能抗凝固薬. 日本臨牀 49 (増刊号)：175-183, 1991
- 8) Cheung AK, Hohnholt MH, Leypoldt JK, DeSpain M：Hemodialysis Membrane Biocompatibility：The Case of Erythropoietin. Blood Purif 9：153-163, 1991
- 9) 永瀬道臣, 津田彰一, 酒井清孝：PMMA, PAN および RC 膜への β_2 -microglobulin の吸着特性. 腎と透析 25：59, 1988
- 10) 松井則明, 中村義弘, 安藤亮一, 栗山廉次郎, 小倉三津雄, 芝紀代子, 中川成之輔：各種血液透析膜における吸着タンパクの詳細研究. 人工臓器 22：70-73, 1993
- 11) 鈴木庸子, 小久保謙一, 萩原一仁, 金森敏幸, 酒井清孝：中空糸透析膜の ζ 電位測定 of 改良. 人工臓器 22：53-57, 1993
- 12) 内藤 明, 老沼正芳, 酒井清孝, 渡辺哲夫, 今村和夫, 鶴見 隆, 須磨靖徳：血液透析膜のイオン透過性と膜表面電位. 人工臓器 17：65-68, 1988
- 13) 小久保謙一, 金森敏幸, 酒井清孝：タンパク質の吸着が膜の荷電に及ぼす影響. 人工臓器 22：74-78, 1993
- 14) 浅川直樹, 津野昌紀, 佐伯保治, 柿本文雄, 服部禎一, 上山政昭, 篠田愛信, 三宅康夫：蛋白の高速液体クロマトグラフィー (第5報) インシュリンのガラス表面への吸着について. 薬学雑誌 103：518-523, 1983
- 15) 長坂 肇, 宮崎哲夫, 内藤秀宗：血液透析 透析膜の高分子化合物吸着能 その他の薬物. 日本臨牀 49 (増刊号)：190-195, 1991