分離膜を使用しない携帯型血液浄化装置の開発[†]

山下明泰・崎山亮一・山口清和・東條角治

九州工業大学情報工学部 生物化学システム工学科, 820-8502 飯塚市大字川津 680-4

食用寒天ゲルまたは植物組織培養用ゲル(ゲルライト®)中に活性炭や酵素を分散させた溶質除去装置を試作した。水道水(または生理食塩水)に(食用または培養用)ゲルの粉末を加え、1) そのままの状態、2) 活性炭または、3) ウレアーゼを分散させてから、底板に小穴が開いたアクリル管中で固化させた(以下、各々A型、AC型およびAU型モジュールと略)。これらの寒天の長さ方向に小穴を21個あけ、血液流路を確保した。クレアチニン、プロモフェノールブルー(BPB)、あるいは尿素の水溶液を疑似体液とし、各モジュールの除去特性を評価した。BPB濃度はA型モジュールでは10%程度低下したが、AC型モジュールでは、用いた活性炭量に応じた速度で低下した。AC型モジュールではクレアチニンとBPBの同時・緩徐・連続除去も可能であった。またAU型モジュールにより、尿素の連続分解も可能であった。これらのモジュールと小型限外濾過器を組み合わせれば、携帯型人工腎臓を構築できる可能性がある。

緒 言

血液透析型人工腎臓は、体内に大量に蓄積する除去対象小分子溶質に対して、高い除去能を有する点で優れた治療法といえる。しかしこの治療では、通常120~150リットルの精製電解質水溶液(透析液)を必要とするため、装置(透析器)の小型化を図っても、治療システムを携帯することは困難である。透析液を用いない方法としては、活性炭などの吸着剤を用いる血液吸着療法があるが、吸着速度が速やかで非生理的なため、急性の毒物中毒治療以外には用いられていない。本研究では連続的に緩徐な溶質除去法を、24時間携帯することを目的に、寒天(食用寒天または植物組織培養用寒天)中に活性炭や酵素を分散させた溶質除去装置を試作した。寒天は固形化された“透析液”に相当する役割をし、除去対象溶質は濃度差により、その内部へ拡散・除去される。寒天中に分散された活性炭や酵素は、“透析液”を連続的に浄化するための二次的なデバイスとして機能する。本研究では、寒天のみのモジュール、および寒天中に活性炭またはウレアーゼを分散させたモジュールを試作し、単一成分系および二成分系水溶液における溶質除去能について検討した。

1. 実験方法

1.1 モジュールの作製

長さ25 cm、直径6.4 cmのアクリル管の一端に、アクリル製の底を接着し、ここに直径2.0 mmの小穴41個を開け、モジュールの外筒とした。

1.1.1 食用寒天と水道水を用いたモジュール 水道水0.3 dm³を煮沸させ、これに市販食用寒天粉末(伊那食品工業(株): 2.4×10⁻³, 2.8×10⁻³または3.2×10⁻³ kg)を加えた。これをこのままの状態、用意したアクリル管中で固化させたモジュールをA(Agar)型、固化する前に洗浄した粒状活性炭(ナカライテスク(株): 4.0×10⁻³, 8.0×10⁻³, 12.0×10⁻³または16.0×10⁻³ kg)が均一に分散するように、攪拌しながらアクリル管中で固化させたモジュールをAC(Agar+activated Charcoal)型、固化する

前に0.5×10⁻³ kgのウレアーゼ(ナタ豆製, 和光純薬工業(株))を均一分散させてから、アクリル管中で固化させたモジュールをAU(Agar+Urease)型と名付けた(Fig. 1)。これらの寒天の長さ方向に、直径3.0 mmの小穴を21個あけ、血液の流路を確保した。寒天が固化した後、一度寒天を取り出し、モジュール底部に厚さおよそ2 cmのスポンジ(空隙率70~90%)を敷いて出口部の液溜まりとし、その上に改めて取り出した寒天を挿入した。

また、上述のウレアーゼ分散寒天と活性炭分散寒天をスポンジを挟んで2段に重ねたモジュールをAUC(Agar+Urease & activated Charcoal)型と命名し、尿素とクレアチニンの二成分系除去実験に用いた。

モジュールの名称として、たとえば水道水(Tap water)と食用寒天粉末“x”×10⁻³ kg、活性炭“y”×10⁻³ kgを用いて作製したモジュールの場合、“T-AxCy”と表示した。また、これと寒天粉末量は同一で活性炭量だけが異なる場合には、T-AxC型モジュール、活性炭量が同一で寒天粉末量だけが異なる場合には、T-AxCy型モジュールなどの総称も用いた。

1.1.2 ゲルライト®と生理食塩水を用いたモジュール 血液系実験の予備的な検討を行うため、水道水の代わりに生理食塩水(normal Saline) 0.3 dm³、食用寒天の代わりに機械的強度と耐酸性、耐薬品性に優れる植物組織培養用ゲル、ゲルライト®(Gelrite®, 和光純薬工業(株))粉末2.4×10⁻³ kg、活性炭8.0×10⁻³ kgを用いて同様なモジュールを作製し、これを“S-G 2.4 C 8”型モジュールと表示した。作製したモジュールをTable 1にまとめた。

1.2 水溶液系循環実験

1.2.1 単一成分系実験 クレアチニン(分子量113) 1.0×10⁻⁵ kg, プロモフェノールブルー(以下BPB, 分子量670) 9.0×10⁻⁶ kg, あるいは尿素(分子量60) 8.0×10⁻⁴ kg(尿素中の窒素換算量で3.73×10⁻⁴ kg)のいずれかを水道水または生理食塩水1.6 dm³に溶解し、これを疑似体液として用いた。疑似体液を0.2 dm³/minで循環し、試作した寒天モジュールの溶質除去特性を310 Kで調べた。またこれとは別に、活性炭を単独で用いた場合の溶質除去特性についても調べた。

1.2.2 二成分系実験 尿素8.0×10⁻⁴ kgとクレアチニン1.0×10⁻⁵ kgの2成分を溶解した水道水溶液1.6 dm³を用いて、

[†] 1997年4月8日受理
化学工学会第61年会(名古屋, 1996年4月)にて発表

Fig. 1 Experimental apparatus showing a close view of a newly developed agar module

Table 1 Modules and solutions used in experiments

Module #	Name	Water (0.3 dm³) for the module	Edible agar powder ($\times 10^3$) [kg]	Gelrite® ($\times 10^3$) [kg]	Charcoal ($\times 10^3$) [kg]	Urease ($\times 10^3$) [kg]	Solution (1.6 dm³) solute(s)/solution	Figure #
1	T-A2.4	tap water	2.4	***	***	***	BPB/tap water	2, 3, 4
2	T-A2.4C4	tap water	2.4	***	4.0	***	BPB/tap water	2, 3, 4
3	T-A2.4C8	tap water	2.4	***	8.0	***	BPB/tap water	2, 3, 4
4	T-A2.4C12	tap water	2.4	***	12.0	***	BPB/tap water	2, 3, 4
5	T-A2.4C16	tap water	2.4	***	16.0	***	BPB/tap water	2, 3, 4
6	T-A2.4C8	tap water	2.4	***	8.0	***	BPB/tap water	5
7	T-A2.8C8	tap water	2.8	***	8.0	***	BPB/tap water	5
8	T-A2.4U0.5	tap water	2.4	***	***	0.5	Urea/tap water	6
9	T-AUC	tap water $\times 2$	2.4 $\times 2$	***	8.0	0.5	Urea & creat./tap water	7
10	S-G2.4	S. sol'n	***	2.4	***	***	BPB/S. sol'n	8
11	S-G2.4C8	S. sol'n	***	2.4	8.0	***	BPB & creat./S. sol'n	8, 9

Abbreviations : T...tap water C...activated charcoal BPB...Bromophenol blue
A...edible agar S...normal saline creat...Creatinine
G...Gelrite®

T-AUC 型モジュールの除去特性を検討した。

また、高濃度の塩の存在が本システムに与える影響および血液系実験を行うための予備的検討を目的に、水道水の代わりにクレアチニン 1.0×10^{-5} kg と BPB 9.0×10^{-6} kg を溶解した生理食塩水を用いて、S-G 2.4 C 8 モジュールの二成分系評価実験を行い、単一成分系の場合と比較した。

実験に用いた水溶液を、使用したモジュールと対照させて Table 1 に記した。

2. 理 論

モジュール前後での除去効率 ($=1 - \text{出口濃度} / \text{入口濃度}$) が一定の場合、この値に血流量を乗じた値をクリアランス $C_L [\text{dm}^3/\text{min}]$ と呼ぶ。クリアランスはモジュール全体をブラックボックスと見なすとき、装置の溶質除去性能を表す定数である。このクリアランスを用いると、疑似体液槽における物質収支は、

$$\frac{d(V_B C_B)}{dt} = -C_L C_B \quad (1)$$

となる。ここで C_B は試験液中溶質濃度 $[\text{kg}/\text{dm}^3]$ 、 V_B は試験液容積 $[\text{dm}^3]$ である。これを容積一定のもとに解き、

$$\frac{C_B}{C_B(0)} = \exp\left(-\frac{C_L}{V_B} t\right) \quad (2)$$

が得られる。溶質の除去速度は、この(2)式から得られる C_L を用いて比較した。

3. 実験結果および考察

3.1 水道水溶液系実験

Fig. 2 は BPB の水道水溶液 1.6 dm^3 と、食用寒天 (2.4×10^{-3} kg) 中に活性炭を分散させた T-A 2.4 C 型モジュールを用いて行った除去実験の結果である。縦軸は初期濃度で正規化した溶液中の BPB 濃度である。BPB は活性炭に対して強い親和力があることが知られている。したがって、活性炭 8.0×10^{-3} kg を単独で用いると、実験開始直後に急激な濃度低下を示し、およそ 8 時間ではほぼ全量 (9.0×10^{-6} kg) の BPB が除去された。このような急速除去法は、急性治療の場合には有用であるが、本研究の目的である 24 時間連続除去を行う携帯型治療にはそぐわない。また、モジュール T-A 2.4 (食用寒天のみ) を用いると、実験開始 24 時間目までに溶質濃度はおよそ 10% 程度低下したが、その後は若干上昇傾向を示した後はほぼ一定値を示し、それ以上の濃度低下は見られな

Fig. 2 Evaluation of T-A 2.4 C type modules with various amount of activated charcoal in removing BPB from its tap water solution

Fig. 3 Time course of normalized BPB concentration profile "x" represents time in hour and "y" represents natural logarithm of the normalized BPB concentration (dimensionless) in regression analyses

かった。これに対して T-A 2.4 C 型の 4 種のモジュールを用いると、実験終了時まで連続的かつ緩徐な溶質除去ができた。また 8.0×10^{-3} kg 以上の活性炭を用いた (C 8 型, C 12 型, C 16 型) 場合、実験終了時 (192 時間目) までに、ほぼ全量の BPB を除去することができた。

Fig. 2 を片対数で表示したのが Fig. 3 である。(2) 式の関係が良好に満足されていることがわかった。この直線の勾配からクリアランスを算出し、これを寒天中に分散させた活性炭量に対してプロットすると、Fig. 4 が得られる。この図より、T-A 2.4 C 型モジュールにおけるクリアランスは、寒天中に分散させる活性炭量に対して、ほぼ正比例の関係にあることがわかる。したがって用いる活性炭量を変えることで、溶質の除去速度を任意に設定できる

Fig. 4 Relationship between BPB clearance and amount of charcoal dispersed in the agar in T-A 2.4 C type modules. "x" represents amount of charcoal in kg and "y" represents BPB clearance in dm^3/min in regression analyses

Fig. 5 Effect of amount of agar powder on the rate of BPB removal. "x" represents time in hour and "y" represents natural logarithm of the normalized BPB concentration (dimensionless) in regression analyses

ことが示唆された。

Fig. 5 には、寒天粉末量を変えて作製した 2 つの T-AC 8 型モジュールを用いて行った、BPB 除去実験の結果を片対数で示した。寒天粉末を 2.4×10^{-3} kg から 2.8×10^{-3} kg に増量すると、クリアランス (直線の勾配) は 34% 低下した。寒天粉末を増量することで、固化した寒天のゲルマトリックスの最小単位 (編目構造) がより複雑に発達する。これにともなって寒天中の見かけの拡散係数が低下したために、このような現象が起きたものと考えられる。すなわち、溶質の除去速度は用いる寒天の量を変えることによっても制御できる可能性がある。

血液透析を携帯化するために、透析器の透析液側に寒天と活性炭を用いる方法が既に報告されており (Tsuruoka *et al.*, 1979), クレアチニンの除去に成功している。しかし尿素は活性炭にほとんど吸着されないため、この方法では尿素的除去が困難である。Fig. 6 は T-A 2.4 U 0.5 モジュールを用いて、尿素的除去を行った実験の結果を、活性炭のみ、および T-A 2.4 モジュールを用いた場合の結果と合わせて示した。後 2 者においても、初期において

Fig. 6 Performance evaluation of module T-A 2.4 U 0.5 in removing urea-nitrogen

Fig. 7 Simultaneous removal of urea and creatinine with Module T-AUC

若干の濃度低下が見られたが、5時間目以降は逆に濃度の上昇を認め、最終的にはそれぞれ初期濃度の95%および80%程度の値に収束した。活性炭の場合この現象は、活性炭が尿素に対して弱い吸着能を有し、吸着とこれに続いて起こる解離によって生じるものとして知られている (Muirhead, 1948, De Marchi, 1951, Pallotta, 1960)。T-A 2.4 モジュールにおいても同様な現象が生じたものと考えられる。T-AU 型モジュールを用いた場合にも、初期の濃度低下は他の2つの実験とほぼ同様であった。このことから初期の濃度低下は、主として寒天内への尿素の取込み (分子拡散) に依存した現象と思われた。しかし AU 型モジュールを用いた場合には、その後も48時間に渡って緩やかな濃度の低下を認めた。これは寒天中のウレアーゼにより、尿素がアンモニアと二酸化炭素に連続的に分解されたために見られた現象と考えられる。

Fig. 7 は尿素とクレアチニンの二成分水道水溶液と T-AUC 型モジュールを用いて行った実験の結果である。活性炭を単独で用いた場合のクレアチニンの急速な濃度減少と、尿素濃度の一時的な減少とその後の上昇については、前述と同様である。これに対して、T-AUC 型モジュールを用いると、尿素とクレアチニンを同時に、かつ連続的に除去することが可能であった。24時間目以降、尿素濃度の減少速度が若干緩やかになっており、これは酵素

Fig. 8 Performance evaluation of module S-G 2.4 C 8 in removing BPB

Fig. 9 Simultaneous removal of creatinine and BPB with module S-G 2.4 C 8 from the binary mixture normal saline solution

の失活に起因する可能性がある。しかし物質除去効率や抗血栓性の観点から、本システムにおけるモジュールは6~12時間程度に1回交換を行う必要があるため、この問題は実用化に際し、大きな障害にはならない。尿素のように吸着親和性が低い物質の除去には、寒天中の着目溶質を酵素で分解することにより、連続的な除去が可能となる可能性がある。この実験では AU 型に AC 型を繋いだモジュールを用いたが、この順番を逆転して AC 型に AU 型を繋いで実験を行うと、溶液が白濁し、最終 pH がおよそ11まで上昇した。このような現象は、この場合に特異的に見られることから、尿素の分解で発生したアンモニアが、下層の AC 型モジュールで除去されているものと思われた。

Chang らはマイクロカプセル化した活性炭 (Chang, 1964) やウレアーゼ (Chang and Malouf, 1978) を用いて、同様な結果を報告しているが、微粒子や微粉末のマイクロカプセル化には特殊な技術が必要とし、しかも吸着能や酵素活性の低下は避けられない。本モジュールでは48時間の実験終了までに、活性炭 (微粉末) の流出は認められなかった。酵素の流出についての詳細は不明であるが、実験中、試験溶液中に酵素の活性は観測されなかった。ゲルが活性炭や粉末酵素を固定化するように機能させることができれば、マイクロカプセル化の必要がなくなり、より簡便で効果的なシステムを構築することができる。

3.2 生理食塩水溶液系実験

BPBの生理食塩水溶液とS-G 2.4 (ゲルライト®のみ) およびS-G 2.4 C 8 モジュールを用いて行った実験の結果をFig. 8に示した。水道水溶液系の場合同様、活性炭を単独で用いた場合には初期において濃度が急速に低下し、8時間ではほぼ全量が除去された。また、S-G 2.4 モジュールでは30%程度の除去率で収束した。これに対してS-G 2.4 C 8 モジュールでは、24時間で50%の除去が可能であった。

Fig. 9にはクレアチニンとBPBを溶解した試験溶液に対し、S-G 2.4 C 8 モジュールを用いて行った二成分系の除去実験の結果を示した。クレアチニンとBPBの両溶質を同時に、かつ単一成分系の場合とはほぼ同じ速度で除去することができた。この実験では初期において、クレアチニンの濃度低下の方が速やかであったが、10時間目で逆転が起こり、それ以降はBPBの方が大きな濃度低下が観測された。ゲルライト®中への拡散速度は分子量の小さいクレアチニンの方が大きいものの、活性炭への吸着速度はBPBの方が大きい。そのため、拡散係数(別の実験によれば、ゲルライト®中のクレアチニンおよびBPBの拡散係数は、それぞれおよそ 10×10^{-6} および 1×10^{-6} cm²/s) と濃度差との積に比例する除去速度は、途中でBPBの方が上回ったものと考えられる。

結 論

寒天中に活性炭や酵素を分散した血液浄化用モジュールを試作し、緩徐で連続的な溶質除去を水溶液系実験で実現した。この寒天モジュールは、寒天中に分散させる吸着剤や酵素を種々に変更したり、寒天を多段に重ねて用いることにより、多成分の溶質除去も可能であった。このモジュールの使用には、血液の体外循環を前提としているので、小型限外濾過フィルターを組み合わせ、

腎不全患者の体内に蓄積する水分の除去を行えば、携帯可能な血液浄化システムを構築できる可能性がある。

Nomenclature

C	= concentration	[kg/m ³]
C_L	= solute clearance	[dm ³ /min]
Q	= flow rate	[dm ³ /min]
t	= time	[min]
V	= volume of the test solution	[dm ³]
<Subscript>		
B	= body or blood	
i	= inlet	
o	= outlet	

Literature cited

- Chang, T. M. S.; "Semipermeable Microcapsules," *Science* **146**, 524-528, (1964)
- Chang, T. M. S. and C. Malouf; "Artificial Cells Micro-Encapsulated Multi-Enzyme System for Converting Urea and Ammonia to Amino Acid Using α -Ketoglutarate and Glucose as Substrate," *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **24**, 18-24 (1978)
- De Marchi, A. and R. Bronnimann; "Construction d'un Rein Artificiel Base sur les Proprietes Physico-Chimiques de Resines Synthetiques. Resultats Pre-liminaires," *Helv. Chir. Acta* **18**, 133-137 (1951)
- Muirhead, E. E. and A. F. Reid; "A Resin Artificial Kidney," *J. Lab. Clin. Med.* **33**, 841-847 (1948)
- Pallotta, A. J. and T. Koppányi; "The Use of Ion Exchange Resins in the Treatment of Phenobarbital Intoxication in Dogs," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **128** 318-320 (1960)
- Tsuruoka, S., K. Sakai and M. Inoue; "Kantenn-juutenn-gata Jinkou-jinzou no Keitai Shiyō niokeru Kiso-teki Seinō Hyōka," *Jpn. J. Artif. Organs*, **8**, 565-568 (1979)

Development of a Novel Portable Blood Purification System with no Membrane for Separation

AKIHIRO C. YAMASHITA, RYOICHI SAKIYAMA, KIYOKAZU YAMAGUCHI and KAKUJI J. TOJO

Department of Biochemical Engineering and Science, Kyushu Institute of Technology, Iizuka 820-8502

Key words: diffusion, adsorption, hemodialysis, hemofiltration, portable artificial kidney.

A blood purification module is developed with edible agar or Gelrite® for plant tissue culture in which charcoal/enzyme was dispersed. Tap water (or normal saline) is boiled and agar (or Gelrite®) powder was dissolved in it. The solution was hardened with either no additive, activated charcoal or urease in a plastic hard shell with a perforated bottom plate to assemble Module A (Agar only), AC (Agar with Charcoal) or AU (Agar with Urease), respectively. The hardened gel was thrust with a plastic straw 21 times in the flow direction. Aqueous test solution was prepared for the experiment. Bromophenol blue (BPB) concentration decreased only by 10% with Module A, whereas it gradually decreased according to the amount of activated charcoal dispersed in the agar with Module AC; moreover, it reached its lower-limit, found by direct use of the same amount of intact activated charcoal. Module AC can also remove BPB and creatinine at the same time from the binary-solute test solution. To reduce urea and creatinine concentrations with one device, Module AUC was also assembled by combining AC and AU modules that should trap creatinine and decompose urea into ammonia and carbon dioxide. A portable artificial kidney system may be constructed by a combination of these modules with a small hemofilter for removing excess water.