血漿濾過における限外濾過膜の性能評価

吉田章一郎*・早野 茂夫*・竹内 啓**・舟久保康***

*東京大学生産技術研究所 〒106 東京都港区六本木 7-22-1 **東京大学農学部畜産獣医学

科 〒113 東京都文京区弥生 1-1-1 ***東京大学工学部精密機械工学科 〒113 東京都文

京区本郷 7-3-1

Evaluation of Ultrafiltration Membrane Characteristics in Plasma Filtration

Shoichiro Yoshida*, Shigeo Hayano*, Akira Takeuchi** and Hiroyasu Funakubo***

* Institute of Industrial Science, University of Tokyo, Roppongi Minato-ku, Tokyo 106

** Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Yayoi Bunkyo-ku, Tokyo 113

*** Faculty of Engineering, University of Tokyo, Hongo Bunkyo-ku, Tokyo 113

(Received July 23, 1982)

The water permeation and macromolecule retention characteristics of hollow-fiber membranes in plasma filtration were investigated. The filtrate-flux increased with an increase in a transmembrane pressure difference, but the rate of increase of flux gradually decreased even at a low pressure difference because of concentration polarization. At a constant pressure difference, the filtrate-flux was dependent only on a wall shear rate per length of hollow-fiber, $\dot{\gamma}/l$. The filtrate-fluxes at the same value of $\dot{\gamma}/l$ were measured; the linear relationship between a pure water flux and a plasma filtrate flux was obtained regardless of the membrane type, from that the water permeability of membrane itself could be evaluated. By gel chromatography, it was found that plasma proteins were retained by the membrane with a cut-off molecular weight of 50000. The polyamide membrane filter having the highest flux among the filters tested was applied to the plasma-purification system composed of an urease column, an ion-exchanger column and an activated charcoal column. The water including the uremic toxins such as urea and creatinine was consequently removed from plasma without leakage of plasma protein at a flow rate of 1.0 ml/min and a low transmembrane pressure difference such as 50mmHg.

Key words: Ultrafiltration membrane, Plasma filtration, Plasma-purification system, Artificial kidney.

1. 緒 言

現在腎不全患者に対して用いられている透析方式の人工腎臓は、大量の透析液を必要とする大型装置であるため、通院して治療を受けなければならず、患者の社会復帰を困難にしている¹⁾。したがって、長期間使用可能な装着用または携帯用の小型人工腎臓の開発が要望されている。近年、人工腎臓の小型化を目指して透析方式に代わる濾過または吸着方式の人工腎臓に関する研究が増加しているが、まだ実用の段階には至っていない。小型化するためには、濾過、限外濾過、吸着、イオン交換など

の分離手段を組み合わせる必要があるが、白根らによって、Fig. 1 に示すような濾過・吸着方式の血液浄化システムが提案されている²⁾。血液を直接浄化処理すると、凝血や溶血などの問題が発生しやすいため、血液から分離した血漿を浄化処理し、最後に血球成分と合わせて生体に返す方式を採用している。

一方、免疫性疾患、血液疾患、がんなど種々の疾病に対して、血漿交換療法が有望視されている。血漿交換療法において、少なくとも血漿たんぱくを回収してもとに戻すための限外濾過を適用すれば、新鮮血漿の輸血量が少なくてすむとされている³⁾。

そこで、本研究においては、血漿から水分を除去し、合わせて低分子量毒性物質の一部を除去するための限外濾過膜開発の指針を得るために、各種中空糸膜の性能評価を行った。血漿の限外濾過において最も障害となる濃度分極現象については、既に A. S. Michaels⁴⁾, M. C. Porter⁵⁾, K. Isaacson⁶⁾ らによって解析されているが、主として高圧力差におけるゲル層支配領域を扱っている。著者らは、システム全体の圧力バランスと膜の劣化防止を考慮し、低圧力差における膜性能について検討した。

2. 実 験

2・1 試薬

試薬は、可能なかぎり市販特級品を用いた。血液凝固阻止剤として、ノボ社製のヘパリン・ナトリウム注射液

Fig. 1 Block diagram of filtration-adsorption type artificial kidney

(5000 単位/ml) を用いた。尿素窒素 および クレアチニンの吸光分析には、それぞれ和光純薬製の Urea-Test キットと Creatinine-Test キットを用いた。

2・2 血漿の調製

ヘパリンを 10 単位/ml 含む豚の新鮮血液を遠心分離し、その上澄液を血漿として実験に用いた。遠心分離機 (Sorval RC 2-B 型) の回転数は 3000rpm, 遠心時間は 15min, 温度は $10 \pm 1^\circ\text{C}$ で行った。調製した血漿による実験は全て 12 時間以内に行った。

2・3 限外濾過実験

限外濾過に用いた中空糸膜モジュールを Table 1 に示す。A～F は濾過用として、G～I は透析用として作られたモジュールである。分画分子量 (以下 CMW と略記する) は、タンパク質基準である。

純水と生理食塩水の膜透過係数の測定および血漿の限外濾過実験には、Fig. 2 に示す装置を用いた。血漿の限外濾過実験は、次のように行った。ヘパリン含有 (10 単位/ml) 生理食塩水を濾過器内と全流路に満たしておき、供給循環ポンプ (チューブポンプ RP 型, 東京理化工機製) によって血漿を濾過器の中空糸内に送液した。全流路が血漿に置き換わってから、約 1 l の血漿を循環した。中空糸外に透過する濾液を、吸引ポンプ (マイクロチューブポンプ MP-3 型, 東京理化工機製) によって取り出した。膜間圧力差 (以下 ΔP と略記する) は、吸引ポンプの回転数によって調節した。 ΔP は、濾過器の入口と出口の圧力の平均値と濾液側の陰圧力との差から求めた。濾液流束の測定は、圧力が安定し定常状態になってから行った。血漿と濾液を適当な間隔で採取し、

Table 1 Physical characteristics of hollow fiber membrane

Filter	Material of membrane*	Effective surface area (m ²)	Number of fibers	Inside diameter (mm)	Membrane thickness (mm)	CMW**
A Nitto Capillary (Nitto Denko)	PA	0.09	300	0.6	0.2	10000
B Nitto Capillary (Nitto Denko)	PA	0.09	300	0.6	0.2	50000
C Nitto Capillary (Nitto Denko)	PS	0.09	300	0.6	0.2	20000
D IL-100 (Asahi Kasei)	PAN	0.2	400	0.8	0.3	6000
E CL-100 (Asahi Kasei)	PAN	0.2	400	0.8	0.3	13000
F PAN-15 (Asahi Medical)	PAN	1.4	11500	0.2	0.05	55000
G B2-M (Toray)	PMMA	1.36	9500	0.24	0.04	—
H KL-2 (Kuraray)	PVA	0.12	—	—	—	1000
I NF-01 (Nipro)	Cuprophane	1.05	—	—	—	—

* PA: Polyamide, PS: Polysulfone, PAN: Polyacrylonitrile, PVA: Polyvinyl alcohol, PMMA: Polymethylmethacrylate. ** CMW is cut-off molecular weight.

Fig. 2 Schematic diagram of the test circuit used for characterization of ultrafilter
a: Ultrafilter, b: Roller pump, c: Inlet pressure gauge, d: Outlet pressure gauge, e: Vacuum gauge, f: Test solution, g: Filtrate, h: Graduated cylinder.

Fig. 3 Flow sheet of the purification system of plasma
a: Ultrafilter, b: Urease column, c: Ion exchange column, d: Activated charcoal column, e: Roller pump, f: Inlet pressure gauge, g: Outlet pressure gauge, h: Vacuum gauge, i: Test solution, j: Filtrate.

総タンパク濃度を屈折率測定(手持屈折計 N-20 型, アタゴ製)により, 尿素とクレアチニンの濃度をそれぞれジアセルチルモノオキシム直接法と Folin-Wu 法吸光分析により求めた。また, 血漿と限外濾液の高速ゲルクロマトグラフィを, 日本分光製トライロータ型ポンプと UVIDEC 100 型紫外吸収検出器を用いて行った。操作条件は以下のとおりである。カラム: TSK-GEL G2000 SW (7.5mm ID×600mm), 溶離液: 1/15M リン酸緩衝液+0.2M NaCl, pH=7.0, 流速: 1.0ml/min, 検出器: UV 280nm, 試料注入量: 20 μ l。血漿試料は, 溶離液で 10 倍に希釈したのち, ミリポアフィルター(孔径 0.45 μ m)で濾過した濾液を注入した。限外濾液はそのまま注入した。

2・4 血漿浄化システムによる実験

システムのフローシートを Fig. 3 に示す。約 2l の血漿を 12ml/min で循環した。限外濾液量は, 吸引ポンプにより 1ml/min に固定した。各コンポーネントは以下に示すとおりである。限外濾過器: Nitto Capillary (B), ウレアーゼカラム: 固定化ウレアーゼ 4ml と固定化炭酸脱水酵素 4ml の混合物, イオン交換カラム: 無機イオン交換体 (Na 型) 428ml と弱酸性イオン交換樹脂 (H 型) 22ml の混合物, 活性炭カラム: 熱硬化性樹脂由来の活性炭 30ml。

3. 結果と考察

3・1 膜の透水性

Table 2 に, 膜の基本特性である純水および生理食塩水の膜透過係数を示す。透過係数は, 流束 (J , cm/min) 対 ΔP (mmHg)プロットの直線の傾きから求めた。濾過器 C, F を除いて CMW の大きい膜ほど透過係数が大きい。これは, CMW が大きければ膜の孔径が大きく, 水の拡散抵抗が小さいためである。しかし, C は A や E よりも CMW が大きい膜にもかかわらず透過係数が小さい。また, F が最も CMW の大きい膜にもかかわらず透過係数が小さい。これは, 透水性が膜の孔径だけでなく, 膜の厚さ, 膜の微細構造, 膜材料の親水性にも依存するためである。濾過用に作った A~F の膜は, 薄い密層と厚い多孔質層から成る不均質構造をもっているのに対して, G~I の透析膜は, 全体が均質な均質構造になっている。したがって, 水の拡散抵抗の小さい濾過膜の方が透析膜より透過係数が大きい。H と I は, このような透析膜であると同時に CMW も小さいので, 本実験のような低い ΔP ではほとんど水が透過しなかった。また, E と F 以外の膜では, 純水よりも生理食塩水の透過係数が大きくなっている。この原因は現在のところ不明である。

Table 2 に示した透水性の異なる膜について, 血漿濾過における濾液の流束 (J_p , cm/min) の圧力依存性を

Fig. 4 に示す。各々の膜において、 ΔP が大きくなると J_p が増加するが、直線とはならずその増加率が減少している。これは、いわゆる濃度分極によって生ずる現象

Table 2 Water permeability of membranes

Membrane	Permeability coefficient	
	10 ⁻⁴ cm min ⁻¹ mmHg ⁻¹ Deionized water	Isotonic saline
A	3.52	3.53
B	11.2	12.0
C	2.36	2.47
D	1.30	1.40
E	4.50	4.30
F	0.55	0.38
G	0.067	0.071
H	≈ 0	—
I	≈ 0	—

である。すなわち、 ΔP が大きくなって J_p が増加すると、排除された溶質が膜表面に畜積されて境膜が形成される。この境膜が水の透過に対して抵抗を示すために、 J_p が ΔP に比例しなくなるのである。特に、タンパク質が6～7%の高濃度で含まれる血漿の場合はその影響が顕著に現われ、避けることのできない現象である。したがって、膜の透水性を評価する場合、この濃度分極を規格化する必要がある。

濃度分極を考慮すると、一定の圧力差における流束は次式によって表わされる⁵⁾。

$$J = (D/\delta_i) \ln(C_w/C_b) = k \ln(C_w/C_b) \quad (1)$$

ここで、 D は溶質の拡散係数、 δ_i は境膜の厚さ、 C_w は膜表面の溶質濃度、 C_b はバルクの濃度、 k は物質移動係数である。同一の原液で温度が一定ならば、 D と C_b は一定と考えるとよい。層流領域では、 k は次式のように表わされる⁵⁾。

$$k = 0.816(\dot{\gamma} D^2/l)^{1/3} \quad (2)$$

Fig. 4 Dependence of ultrafiltrate flux on transmembrane pressure difference with plasma
Ultrafilter—

▲: A, ○: B, ■: C, △: D, ○: E, ●: F, □: G

Fig. 5 Dependence of ultrafiltrate flux on average wall shear rate per unit length for plasma by ultrafilter B

ここで、 $\dot{\gamma}$ は膜表面の壁剪断速度、 l は中空糸の長さ、0.816 は流路壁の状況を示す定数である。なお、中空糸のような円管流路に対しては、 $\dot{\gamma}$ は次式で表わされる⁵⁾。

$$\dot{\gamma} = 4\bar{u}/r \quad (3)$$

ここで、 $\bar{u}$ は血漿の平均流速 (cm/s)、 r は中空糸の内径 (cm) である。(2) 式を (1) 式に代入すると、 J は次のようになる。

$$J = 0.816(\dot{\gamma} D^2/l)^{1/3} \ln(C_w/C_b) \quad (4)$$

Fig. 5 に示すように、 $\dot{\gamma}/l$ に対して J_p を両対数プロットすると直線となった。このことは、 C_w/C_b も一定であり、ゲル層の形成を示唆している。しかし、Fig. 4 に示したように、今回実験した圧力範囲では J_p が ΔP とともに増加していることから、ゲル層支配領域には至っていない。 $\dot{\gamma}/l$ の大きい操作条件すなわち血漿の平均流速を大きくした方が滲液流速が大きくなるが、血液の体外循環流量は 200ml/min が限度とされているので、分離した血漿の流量にも制限がある。したがって、 $\dot{\gamma}/l$ をあまり大きくすることはできない。血漿の流量を 10~20ml/min (血液流量の 1/10) と想定すると、各モジュールに対して $\dot{\gamma}/l$ が 5~10 の範囲になる。なお、血漿の動粘度を $1.57 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$ とすると⁷⁾、この時のレイノルズ数は最大 20 で、層流・乱流の境界領域である 2300 よりはるかに小さいので、層流領域に入っている。

以上の結果から、濃度分極を $\dot{\gamma}/l$ によって規格化することができるので、各モジュールに対して $\dot{\gamma}/l$ が 7 になるように血漿流量を設定して、各中空糸膜の透水性を比較した。Fig. 6 に J_p と純水の流速 (J_w) との関係を示した。横軸の J_w は、膜の孔径、膜の微細構造、膜厚 (特に密層の厚さ)、膜材料の化学的性質などの因子を含んだ値として考えてよい。図に示すように、一定の

ΔP のときの J_p は、膜の種類に関係なく J_w と一定の相関が得られた。点線は傾き 1 の直線であり、 J_p と J_w が等しいときの関係を示している。 J_w の大きい膜ほど J_p は大きくなるが、全体に点線より小さい。これは、血漿の粘性が高いことと、境膜の抵抗によるものである。 J_p の増加率すなわち図の直線の傾きは、 ΔP が大きくなるにしたがって減少し、膜による差が縮まってくる。これは、膜本体の抵抗に境膜の抵抗が加わり、圧力差が増加するとしだいに境膜抵抗が支配的になることを示唆している。もともと流束の小さい膜の場合には、膜表面に運ばれる溶質の量も少なく、境膜抵抗が小さいので、口で示すように J_p と J_w はほとんど同じ値になる。膜の孔径を大きくすれば J_w が大きくなり、したがって J_p も大きくなるが、タンパク質や多糖類などの生体に必要な成分を膜によって阻止する必要があるから、あまり孔径を大きくすることはできない。△で示した値は、CMW 20000 のポリスルホン膜であるが、他の膜に比べて点線に近い値を示している。このことは、血漿タンパクが透過しない程度に可能な限り孔径の大きい膜にすれば、他の膜に比べて J_p の大きい膜になることを示唆している。以上の結果より、一般に用いられている限外滲過膜に対して、血漿滲過の滲液流速がどの程度期待できるかが明らかとなった。

3・2 膜の分離性能

膜の分離性能を評価する 1 つの方法として、高速ゲルクロマトグラフィを行った。Fig. 7(a) に溶離液で 10 倍に希釈した血漿のクロマトグラムを示す。血漿は 3 つの大きなピークと 5 つの小さなピークに分れた。保持時間から推定される分子量と豚の血漿タンパク組成⁸⁾ とを考慮すると、第 1 ピークはフィブリノーゲン、グロブリン

Fig. 6 Relationship between plasma filtrate flux (J_p) and water flux (J_w)
 Material of membrane—
 ○ : PAN, ● : PA, △ : PS, □ : PMMA.

などの高分子量成分、第2ピークは γ -グロブリン、第3ピークはアルブミンである。第4～8のピークは不明だが、低分子量のペプチドであると考えられる。Fig. 7 (b)は、濾液を希釈せずに注入したときのクロマトグラムの1例である。1, 2, 3のピークはほとんど消滅している。血漿は10倍に希釈しているのに、血漿タンパクの90%以上を占める1, 2, 3の成分は、膜によってほとんど阻止されることがわかった。今回実験した膜では、濾液のクロマトグラムにほとんど有意差はなかったので、CMWが約5万の膜で、タンパク質のほとんどを分離できることがわかった。

3・3 血漿浄化システムへの適用

実験したなかで最も J_p が大きかった膜面積900cm²のポリアミド膜モジュール (Nitto Capillary) を、血漿浄化システムに適用した。Fig. 3に示したシステムは、次のような機能をもつ。限外濾過器(a)によって1ml/minの水を除去し、次のウレアーゼカラム(b)によって尿素をアンモニアに変換したあと、生成したアンモニウムイオンをイオン交換カラム(c)で除去する。さらに、活性炭カラム(d)で、尿酸、クレアチニン、中分子量成分等の老廃物を除去して、浄化された血漿を返すものである。Fig. 8に、限外濾過器の入口と出口の圧力および濾液側の陰圧力の時間変化を示す。生理食塩水が

Fig. 7 Gel chromatograms of plasma (a) and plasma filtrate (b)
Operating conditions—
Column: TSK-GEL G2000SW (7.5mmID $\times$ 600mm), Detector: UV280nm, Eluent: 0.2M-NaCl+1/15M-phosphate buffer (pH 7.0), Flow rate: 1.0ml/min, Sample: (a) Plasma diluted 10 times with eluent; (b) Plasma filtrate, Sample size: 20 μ l.

血漿に置き換わるにしたがって、滲液側陰圧力が大きくなるが、40分経過後は安定した。『このときの ΔP は約 50mmHg であり、滲過器の圧力損失は 2~3mmHg と小さかった。Fig. 9, 10, 11 に、それぞれ尿素、クレアチニン、総タンパク質濃度の時間変化を示す。限外滲過器入口の血漿中の尿素とクレアチニンは各コンポーネントで除去されるため時間とともに減少している。滲液中の各成分の濃度は、この減少傾向に添っている。滲液中の濃度が血漿より高い値になっているのは、時間的遅れが生じたためである。すなわち、滲液のデッドボリュームが約 10ml あるので、分析された滲液試料は、10分以上前の濃度の高い血漿から透過した滲液であるためである。

Fig. 8 Variation of pressure with time
○ : Inlet pressure, ● : Outlet pressure,
□ : Pressure external to the fibers.

Fig. 9 Variation of concentration of Urea-N with time
○ : Inlet plasma, ● : Ultrafiltrate.

これらの低分子量成分に対して、入口血漿の総タンパク濃度は、初期に少し減少しているが約 6% に保持されており、滲液中にはほとんど検出されなかった。以上の結果から、短時間の実験ではあるが、膜面積 900cm² のモジュールにより、低い膜間圧力差でタンパク質がほとんど漏出することなく、尿素、クレアチニンを代表とする老廃物を含む水を 1ml/min 取り出すことができた。1ml/min の滲液量は、正常人の生体腎で 1日に除去される水分量、1.5l/day に相当する。流束のより大きい膜が得られれば、除水するために必要な膜面積はさらに小さくて済むことになる。

Fig. 10 Variation of concentration of creatinine with time
○ : Inlet plasma, ● : Ultrafiltrate.

4. 結 論

濃度分極を、壁剪断速度と中空糸膜の長さとの比によって規格化し、各種中空糸膜の流束を測定した結果、純水の流束と血漿滲過における流束との間に一定の相関が得られ、血漿滲過における透水性の見積りができた。ゲルクロマトグラフィの結果より、血漿タンパクを分離するために必要な膜の分画分子量は、約5万でよいことがわかった。さらに、血漿浄化システムへの適用により低圧力差で血漿から水と老廃物の一部を除去するという初期の目的は達成された。

謝 辞

実験に使用した限外滲過モジュールを提供して下さいた日東電工(株)、東レ(株)および旭メディカル(株)に感謝いたします。

Fig. 11 Variation of concentration of total protein with time
○ : Inlet plasma, ● : Ultrafiltrate.

文 献

- 1) 近畿化学工業会編：“膜-その創造と展開”化学増刊64, 化学同人 (1975), p. 38
- 2) H. Funakubo, K. Shirane: *Theoretical and Applied Mechanics*, **28** 525 (1980)
K. Shirane, H. Funakubo: *J. Fac. Eng. Univ. Tokyo* (B), **35**(3) 389 (1980)
- 3) 星 猛, 木村尚史, 丹沢 宏共編：“人工膜”, 化学増刊92, 化学同人 (1981) p. 95
- 4) A. S. Michaels: *Chem. Eng. Prog.*, **64**(12) 31 (1968)
- 5) M. C. Porter: *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **11**(3) 234 (1972)
- 6) A. R. Cooper ed.: “Ultrafiltration Membranes and Applications”, Plenum Publ. Corp., New York, N. Y., p.507 (1980)
- 7) H. W. Dunne, A. D. Leman ed.: “Diseases of Swine” The Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, p. 115 (1975)
- 8) 越川昭三, 桜井靖久, 中林宣男 共編：“人工臓器資料集成”第1版, ライフサイエンスセンター東京 (1976), p. 50