

ダイアライザ吸着成分溶出のコンパートメントモデルによる解析

ーダイアライザのプライミングリンス液吸光分析における考察ー

松浦 宏治・二見 翠・浅原 佳江^{*}・竹本 和憲^{*}・中路 修平

岡山理科大学工学部生命医療工学科

^{*}加計学園医用科学教育センター

(2017年10月11日受付、2017年12月4日受理)

1. 緒言

血液透析療法では体外循環させた患者の血液をダイアライザの透析膜を介して透析液と接触させることにより、主に拡散と限外濾過によって尿毒症物質と水を除去する¹⁾。新しいダイアライザを用いる際には必ずプライミングを行い、プライミングによって血液回路内の気泡およびダイアライザに吸着した不要物質を除去する。本学科では三年次学生実習でのプライミングに関する実習にて、プライミングリンス液の吸収分光分析を毎年行っている。得られた吸収スペクトルの形状変化から吸着成分の溶出状況を把握し、学生たちはプライミング操作の臨床工学的意義について理解を深めている。

当実習で行う実験結果からは、各成分の溶出速度に関しても議論できる。以下の議論は分子構造および薬物動態に関する知識が必要で、臨床工学技士国家試験範囲を超えているために、実習レポートの必要要件として課していない。しかし、実際の臨床現場での吸着療法およびダイアライザ等の製品開発において、本考察が役立つ可能性があるために、紀要の形に整理した。

本紀要においては、得られた吸収スペクトルからダイアライザ内に存在する溶質物質の構造および溶出速度に関して議論する。溶質物質の構造については、吸収スペクトルにおけるピーク形状を基に想定される物質の電子構造を考察することによって物質を可能な限り推測する。また、溶出速度については薬物動態でよく用いられているコンパートメントモデルを適用し、速度定数の解析を行った^{2,3)}。本解析においては、リンス液の溶質成分移動解析を行うためにダイアライザ内部にコンパートメントを設定しており、患者体内から透析液への尿毒症物質の移動に関する従来のコンパートメントモデルでの議論とは異なる。その速度定数に関する議論から、ダイアライザと溶出成分の相互作用の観点から、ダイアライザのプライミングをより深く理解することを目的とする。

2. 実験および解析

2-1 溶出実験と化合物の検出

プライミングにはセルローストリアセート系、ドライタイプの中空糸型ダイアライザを用いた(FB-110EGeco、ニプロ社製)。本実験ではプライミングが目的であるために、毎度新品を開封した。そのプライミング実験回路図を図1に示す。透析装置は東レ社製のTR-3000Sを使用した。実習者は100 mL/minでTR-3000Sのローラーポンプを駆動し、この回路内のダイアライザに蒸留水を通過させて、そのリンス液を試験管に回収した。はじめに得られたリンス液を8 mL回収した時点を0分として、1分ごとに各8 mLのリンス液分画を得た。この操作を10分間程行った。このリンス液の吸収スペクトルを分光光度計(U-2810、日立ハイテックノロジーズ社製)を用いて測定した。測定波長は600から190 nmであった。得られたスペクトルにおける吸光度についてIgor Pro(ヒューリンクス社製)を用いてデータ処理し、指数関数でのフィッティングを行った。

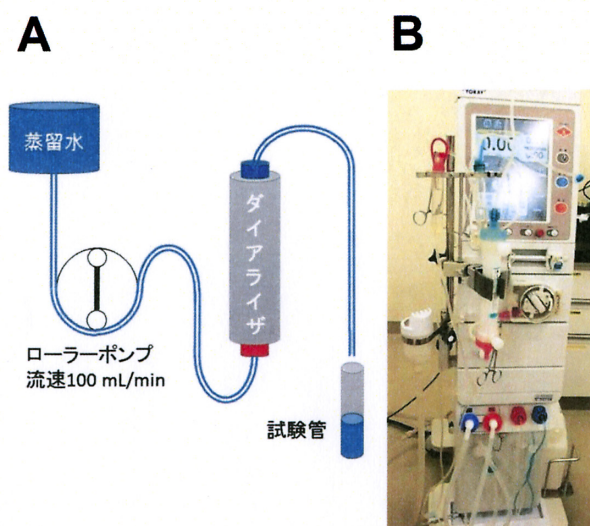


図1：(A)プライミングリンス液回収実験系模式図および(B)その写真

2-2 リンス液の遠心式フィルターユニットによる分子量推定

実習で得たリンス液の一部を、分画分子量(MWCO)が3kD、30kD、および100kDの遠心式フィルターユニット (Amicon Ultra-15、ミリポア社製) に入れて、4000-5000 rpm 5-20分間で遠心処理 (CX16RFII、日立工機社製) した。フィルターユニット膜の通過液およびフィルター内の溶液双方の吸収スペクトルを、分光光度計 (UV-1800、島津製作所社製) を用いて分析した。

3. コンパートメントモデルとその解析方法

3-1 1 コンパートメントモデル

当モデルの概念図を図2 (A) に示す。プライミングで除去されるべき対象成分はただ1つのコンパートメント1内 (中空糸内側の血液流路部分) に存在し、リンス液を流すことによって、その対象成分が速度定数 k_{ei} で溶出されるモデルである。 i は対象成分番号を示し、複数対象成分がある場合は、 i の番号が増えて行く。この際、排出液に含まれる対象成分の濃度は式(1)のように記述される。 X_i はコンパートメント1内の対象成分 i の濃度である。

$$\frac{dX_i}{dt} = -k_{ei}X_i \quad (1)$$

この微分方程式を時間 $t=0$ の初期条件、式(2)の下で解くと、時間 t におけるコンパートメント1内の対象成分 i の濃度 $(X_i(t))$ については式(3)の解が得られる。

$$X_i(t=0) = X_{i,0} \quad (2)$$

$$X_i(t) = X_{i,0}e^{-k_{ei}t} \quad (3)$$

排出液内には対象成分 i は $k_{ei}X_i(t)$ の濃度で存在すると考える。

3-2 2 コンパートメントモデル

当モデルの概念図を図2 (B) に示す。プライミングで除去されるべき1つの対象成分は2つのコンパートメント1 (中空糸内側の血液流路部分) および2 (中空糸膜の細孔部分、分画特性を決定する細孔サイズは5 nm程度) 内に存在するとする。リンス液を流すことによって、その対象成分が速度定数 k_e で溶出されるモデルである。また、コンパートメント1、2間での成分の移動を想定し、1から2への移動に関する速度定数は k_a 、2から1への移動については速度定数を k_d とした。コンパートメント1および2に存在する成分の濃度をそれぞれ X および Y とすると、それらについての成分収支に関する微分方程式は(4)および(5)で記述される。また、1 コンパートメントモデルと同様に排出液内には対象成分は $k_eX(t)$ の濃度で存在すると考える。

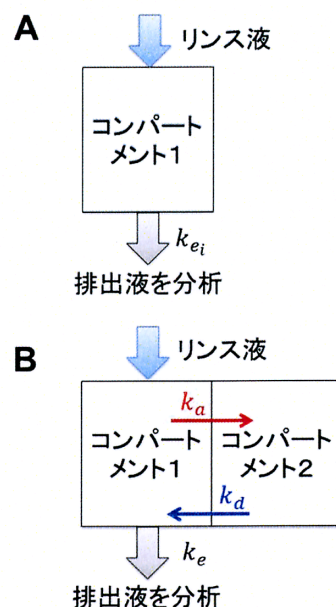


図2: 本研究における (A) 1 コンパートメントモデルと (B) 2 コンパートメントモデルの概略図

$$\frac{dX}{dt} = -k_eX - k_aX + k_dY \quad (4)$$

$$\frac{dY}{dt} = k_aX - k_dY \quad (5)$$

これらを変形すると、二階線形の微分方程式(6)が得られる。ただし $K=k_a+k_d+k_e$ である。

$$\frac{d^2X}{dt^2} + K\frac{dX}{dt} + k_dk_eX = 0 \quad (6)$$

式(6)の特性方程式の解 α_1, α_2 は式(7)のとおりである ($\alpha_2 - \alpha_1 = \sqrt{K^2 - 4k_dk_e}$)。実験結果からは濃度の減衰のみで振動が観察されなかったため、 α は実数である。すなわち、 $K^2 - 4k_dk_e > 0$ である。

$$\alpha_1 = \frac{-K - \sqrt{K^2 - 4k_dk_e}}{2}, \alpha_2 = \frac{-K + \sqrt{K^2 - 4k_dk_e}}{2} \quad (7)$$

$t=0$ における対象成分のコンパートメント1, 2内の濃度 $X(t=0), Y(t=0)$ と移動速度 $dX(t=0)/dt, dY(t=0)/dt$ に関する初期条件は式(8)、式(9)のとおり定義する。これらの値は本実験では未知とする。

$$X(t=0) = X_0, \quad \frac{dX(t=0)}{dt} = \Delta X_0 \quad (8)$$

$$Y(t=0) = Y_0, \quad \frac{dY(t=0)}{dt} = \Delta Y_0 \quad (9)$$

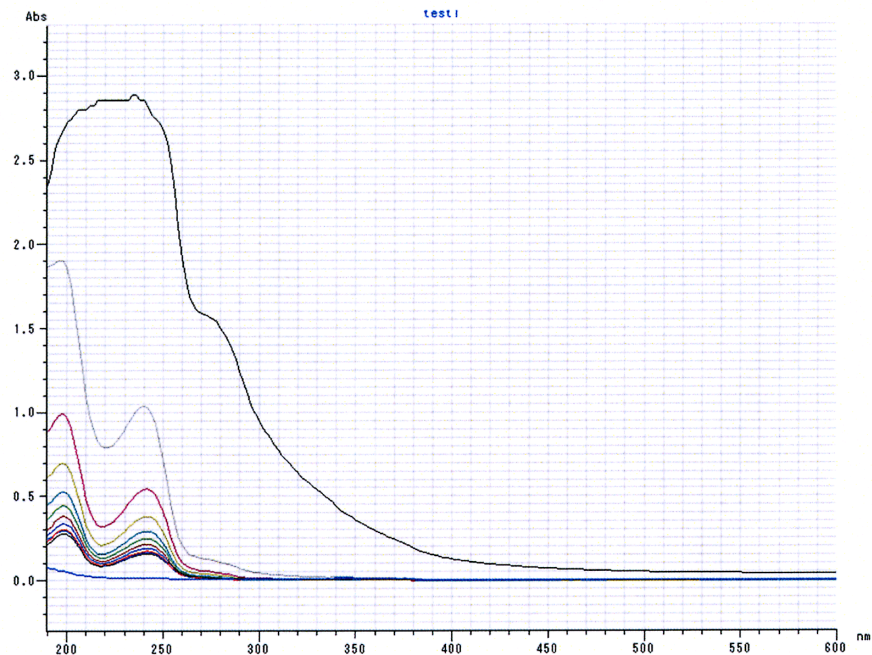


図3：得られた吸収スペクトル 上側のスペクトルから順にフラクション番号の小さい溶液を示す。最下段のスペクトルはダイアライザを含まない回路を通過した蒸留水のスペクトルを示す。

式(10)がそれぞれ時間 t におけるコンパートメント1内における対象成分の濃度である。この場合、 α_1 , α_2 ともに負であるために、 $X(t)$ は時間が経過すれば減少していく。また、同様に $Y(t)$ も算出可能であるが、本実験では議論の対象としないため、 $X(t)$ のみ記載する。

$$X(t) = \frac{\{(K+\alpha_1)X_0+\Delta X_0\}e^{\alpha_1 t} - \{(K+\alpha_2)X_0+\Delta X_0\}e^{\alpha_2 t}}{\alpha_2 - \alpha_1} \quad (10)$$

式(10)については、実験系を考慮すれば、さらに簡単にすることができる。〈A〉速い吸着と非常に遅い脱離の場合(強い吸着)、〈B〉速い吸着と速い脱離の場合(吸脱着平衡)、〈C〉遅い吸着と速い脱離の場合が考えられる。後述するように、排出液量が増えるにつれて、次第に吸収極大が観察されなくなったために、〈C〉のケースを想定し、式(11)のような近似を適用すると、式(10)は式(12)に変形できる。ただし、 $\alpha_2 - \alpha_1 = |k_d - k_e|$ である。

$$k_d \ll k_e, K = k_d + k_e \quad (11)$$

$$X(t) = \frac{(-\alpha_2 X_0 + \Delta X_0)e^{\alpha_1 t} - (-\alpha_1 X_0 + \Delta X_0)e^{\alpha_2 t}}{\alpha_2 - \alpha_1} \quad (12)$$

本実験系では式(8)および(9)の初期条件を定めることができない。ランベルト・ベール則より、濃度 $X(t)$ は吸光度に比例するため、得られた吸光度変化の指数関

数の速度定数(α_1 , α_2)を議論する。この速度定数は式(6)の解である。その速度定数から対象成分の挙動をコンパートメントモデルに当てはめて推測する。フィッティングで求める速度定数は式(13)および(14)である。

$$\alpha_1 = \frac{-1}{2} \{(k_d + k_e) + |k_d - k_e|\} \quad (13)$$

$$\alpha_2 = \frac{-1}{2} \{(k_d + k_e) - |k_d - k_e|\} \quad (14)$$

実験結果から $k_d < k_e$ となることを考慮すれば、それぞれのパラメータは式(15)のように決定できる。以下では、得られた吸光度と速度定数に着目して議論する。

$$\alpha_1 = -k_e, \alpha_2 = -k_d \quad (15)$$

4. 実験結果

4-1 溶出実験と化合物の検出

得られたスペクトルを図3に示す。はじめには黄色の溶液が観察された。次に、240 nm近傍に吸収極大を有するピークが観察され、その強度は排出量が増すとともに低下していった。ベンゼン環の吸収波長がおおよそ250 nmであるために⁴⁾、ベンゼン環またはポリエンを有する水溶性の分子または高分子が溶出されたと推測される。現在、分子構造の同定には至っていないが、他の分光法とも合わせて今後も検討する。

4-2 溶出量評価

240および200 nmの吸収極大を時間に対して図4にプロットした。排出量 $k_e X(t)$ 、その濃度 $X(t)$ と吸光度は時間の関数となっており、排出量と吸光度の関係には線形性があることから、フィッティングで得られた速度定数は吸光度においても排出量と同じであると考えられる。このプロットにおいて、二相性の変化が観察された。このプロットについて、カーブフィッティングを行ったところ、式(16)のようになった。

$$X(t) = O + Pe^{-a_1 t} + Qe^{-a_2 t} \quad (16)$$

式(16)から、240 nmと200 nmの吸収極大における吸光度のフィッティングで速度定数を算出したところ、速い相(a_1)と遅い相(a_2)の速度定数はそれぞれ 2.76 ± 0.19 , 2.33 ± 0.17 と 0.34 ± 0.06 , 0.45 ± 0.09 (min^{-1})であった。

<1>拡散速度の異なる2成分について1コンパートメントモデルを適用する系、あるいは<2>1成分について2コンパートメントモデルを適用する系で評価を行い、<1>と<2>の妥当性について議論する。<1>の場合、得られた吸光度と時定数との関係は、式(3)の線形結合を仮定すれば、上記の式(16)において、 $\alpha_1 = -k_{e1}$, $\alpha_2 = -k_{e2}$ とする。

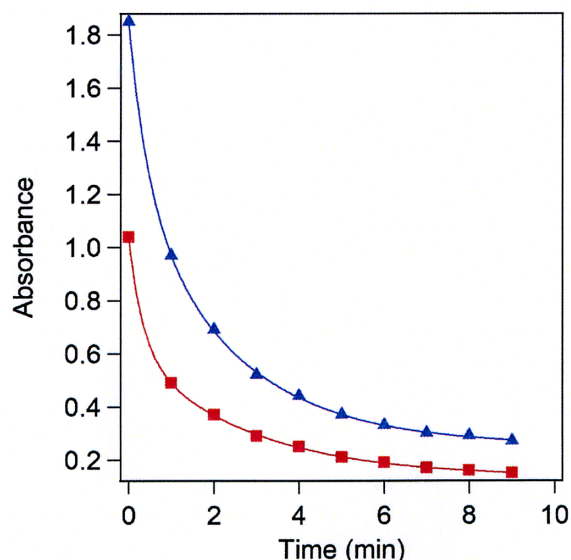


図4：図3のスペクトルにおける240 nm(■)と200 nm(▲)の吸光度の時間変化 実線はフィッティングトレースを示す。

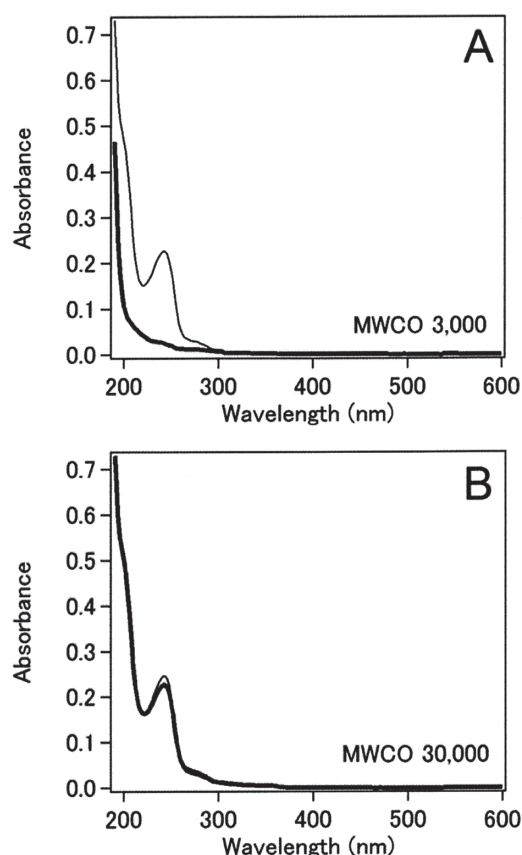


図5：遠心式フィルターユニットを通過したリンス液（太線）とフィルター内のリンス液（細線）の吸収スペクトル (A)MWCO 3kDの場合 (B) MWCO 30kDの場合

<1>の場合、速い相と遅い相における溶出成分の分子量の違いに由来し、上記モデルの速度定数が拡散定数に比例すると仮定すれば、その2成分間の拡散定数の比では4~10倍となると考えられる。このモデルを適用するためには、240および200 nmに吸収極大を有し、かつ2種類の分子量分布を持つ物質群を想定する必要がある。このモデルを適用する場合、得られた速度定数はこれら2種類の物質の拡散係数に対応するとみなせる。

<2>の場合、吸収スペクトルで観察された成分は同じ分子量を持つ成分であり、該当する成分の液相への移動速度がコンパートメントによって異なる系を想定する。速い相の速度定数(α_1)が2~3 (min^{-1})であり、遅い相の速度定数(α_2)が0.3~0.5 (min^{-1})程度とした。

<1>のモデル検証のため、240 nmおよび200 nmに吸収極大を有する成分の分子量推定を遠心式フィルターユニットを用いて行った。

4-3 リンス液内成分の分子量推定

MWCO 3kDおよび30 kDの遠心式フィルターユニットを通過したリンス液と、フィルター内のリンス液の吸収スペクトルを図5に示す。MWCO 3 kDのフィルターユニットを使用した際には、リンス液内の240 nm吸収極大成分はフィルター通過液側では見られなかった(図5A)。同様に200 nm吸収極大も低下していた。しかし、物質が特定できていない現状では、この波長領域に光吸収を示す発色団が複数存在することから、以下では240 nmの吸収極大を与える成分に関して中心に議論する。一方、30 kDのフィルターユニット膜通過液と膜を通過しなかった成分の吸収スペクトルは殆ど同じであった(図5B)。また、MWCO 100kD使用時のスペクトル形状はMWCO 30kDのフィルターユニットを用いた場合とほぼ同じであった(図なし)。従って、得られたリンス液内に存在する成分の分子量は3,000以上、30,000以下と推定される。

分子量300のスクロースと17,000のシトクロム*c*の拡散係数を比較したところ、その比は約5倍程度である⁵⁾。本実験においても得られた双方の速度定数比は8程度であり、5に近かったため、<1>のケースを想定すれば、得られた分子量比は300と20,000程度が想定される。しかし、上記のMWCO 3kDおよび30kDのフィルターユニットを用いたリンス液通過実験結果からは、該当する成分の分子量が3,000-30,000の範囲であったため、得られた2つの速度定数と対応しない。従って、240 nmの吸収極大を有する成分の溶出速度に関しては、1コンパートメントモデルを適用するモデル<1>は考えにくい。

5. 考察

5-1 リンス液の溶出速度に二相性が現れる理由

240 nmの吸収極大が観察された成分の溶出に関しては「中空糸内側の血液流路部分」と「中空糸膜の細孔部分」の2コンパートメントを考慮し、これら2か所からの該当する成分排出を想定するモデル<2>が適していると考えた。中空糸膜の細孔から中空糸内側の血液流路部分への物質移動抵抗が生じるために、遅い相は中空糸膜の細孔に存在する物質の溶出に由来すると考えられる。

血液透析時の薬物代謝に関する報告では、体内の末梢コンパートメントからの薬物透析の時定数は、通常の透析時間の4時間よりも大きいために、2コンパートメントモデルではなく、1コンパートメントモデルでの議論がなされている⁶⁾。中空糸膜と中空糸内側の血液流路部分について考慮したモデルによる溶出速度の二相性に関する議論は見られない状況である。リンス液での溶出物質が分光学的手法などで非侵襲的

にかつ適切に検出されれば、相対的に遅い溶出相が見られる可能性がある。そのため、リンス液の成分に関する溶出速度の議論に基づけば、ダイアライザの特性を溶出速度定数で指標化できるかもしれない。

残念ながら、本研究では200および240 nmの吸収極大を有する物質の同定には至っておらず、当実習は毎年行われるために、今後も物質の同定を続ける計画である。紫外-可視光吸収分析では同定不可能な物質も多くプライミングリンス液には含まれており、グリセリンなど π 電子の割合が小さく、200-300 nmに吸収極大が観測されにくい物質も存在すると推測している。本議論をそれらの物質に適用する場合は、別の測定方法によって定量化すればよい。

5-2 プライミングと本解析法の意義

本研究結果から、プライミング液内物質の溶出においては、<2>の2コンパートメントモデルで記述できる成分があることが示された。中には1コンパートメントモデルの適用が好ましい成分もあると想定されるが、中空糸膜の細孔部分に存在する、あるいは溶出されにくい成分については<2>のモデルを適用した溶出速度に関する議論によって、中空糸膜の物質吸着特性を予測できる。中空糸膜の細孔部分からの溶出が遅れる成分が存在することから、ダイアライザ容積に対して数倍以上のリンス液を用いたプライミングが望ましいことが、本研究結果によっても認識される。

6. 結言

ダイアライザのプライミングリンス液の分画を採取し、その吸収スペクトルを分析することによって、リンス液内溶出成分の溶出速度を評価した。240 nmの吸収極大が観察された成分については分子構造の同定には至らなかったが、フィルターユニット膜通過液分析からは分子量が3,000-30,000の範囲であった。現時点で得られた知見からは、ダイアライザ内部に設定した「中空糸内側の血液流路部分」と「中空糸膜の細孔部分」の2コンパートメントモデルで、該当する成分の排出を記述できる。この分析手法は、ダイアライザのプライミングに効果的な液量の推測、ダイアライザへの物質吸着予測、実際の血液透析時におけるダイアライザ特性の指標化につながると考えている。

謝辞

本実験を行った工学部生命医療工学科、生体機能代行装置学実習IIIの平成29年度履修者に感謝を申し上げる。欧文抄録の英文チェックについては、英文校正エナゴに深謝する。

参考文献

- 1) 竹澤真吾・出淵靖志 編集:臨床工学講座 生体機能代行装置学 血液浄化療法装置 医歯薬出版(2011)
- 2) 加藤基浩:薬物動態の基礎 はじめての薬物速度論 南山堂(2008)
- 3) 九川文彦 編集:徹底解説 薬物動態の数学—微積分と対数、非線形— 廣川書店(2011)
- 4) 山内淳:基礎 物理化学I—原子・分子の量子論—サイエンス社(2004)
- 5) 山本修一:物質移動物性としての拡散係数と水分吸脱着(乾燥),日本食品工学会誌, 11, 2, pp73-83(2010)
- 6) 古場清貴・狩野美香・竹澤真吾・平田純生:薬物の透析性は予測可能か?—第54回日本透析学会シンポジウムより—,透析会誌, 43, 1, pp43-45(2010)

Studying the Elution Kinetics of Components in the Priming-Rinse Dialyzer Solution Using a Two-Compartmental Model

Koji Matsuura*, Midori Futami*,

Yoshie Asahara**, Kazunori Takemoto**, and Shuhei Nakaji*

**Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Okayama University of Science*

***Department of Biomedical Science Educational Center, Kake Gakuen*

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received October 11, 2017; accepted December 4, 2017)

We collected fractions of the priming rinse solution from a dialyzer, and analyzed the elution kinetics of those fractions by recording their UV–visible absorption spectra. Although we could not determine the molecular structure of the components in solution, with a peak maxima at 200 and 240 nm, molecular weight of the components was found to range from 3,000 to 30,000 Daltons, as inferred from the absorption spectra of the flowthrough solution from the centrifugal filter units. Elution kinetics of the components with a peak maxima at 240 nm can be explained by using the two-compartment mathematical model that incorporates the characteristics of the following: (1) Main channel of the hollow fiber, and (2) Nanopores inside the hollow fiber membrane. We propose that this method can be utilized for (a) estimating the appropriate volume of the priming rinse solution, (b) quantifying the degree of adsorption of substances onto the hollow fibers, and (c) studying the adsorption properties of the dialyzer in clinical hemodialysis.

Keywords: dialyzer; priming; compartment model; peripheral compartment; elution kinetics.