

超音波による人工膜の透過促進および腹膜モデルの作製とその評価

大内, 奎 / OUCHI, Kei

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

57

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2016-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00013395>

超音波による人工膜の透過促進および 腹膜モデルの作製とその評価

ENHANCEMENT OF PERMEATION ACROSS AN ARTIFICIAL MEMBRANE BY ULTRASOUND AND
THE EVALUATION OF PERMEABILITY OF A MODELED PERITONEUM

大内奎

Kei OUCHI

指導教員 山下明泰

法政大学大学院理工学研究科応用化学専攻修士課程

In this study, the solute transfer examinations were performed both with a piece of artificial membrane and with a modeled peritoneal membrane. The former included permeation experiment for creatinine with and without irradiating ultrasound (45, 100 kHz). Results showed that the rate of permeation was promoted with ultrasound of 45 kHz and at the same time, destruction of membrane was also observed. The latter experiment also included a solute permeation with a modeled peritoneum that was constructed from Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) and Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Methyl glyoxal (MGO), a possible toxin for the peritoneum, was exposed for 24 hours against to the modeled peritoneum. Result showed that NHDF is weaker to MGO than HUVEC. In both studies, enhancement of permeation due to external stimuli was observed.

Key Words : *ultrasound, permeation, peritoneum, MGO, NHDF, HUVEC*

1. 緒言

末期腎不全患者に対する血液浄化療法には、人工膜を用いる血液透析と生体膜を用いる腹膜透析がある。腹膜透析は長期の治療に伴い腹膜の線維化が生じ、これが進行すると重篤な合併症を発症する。この原因の1つは、透析液中に含まれるグルコース分解産物 (GDP) である。

本研究ではまず、血液透析用平膜について、その溶質透過性を促進することを目的に、超音波の効果について検討した。これは中空糸型人工腎臓についても検討した。

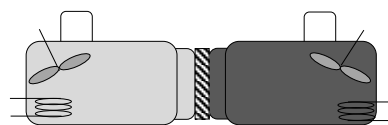
次に同じ方法を腹膜透析に応用した。ヒト皮膚由来線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts : NHDF) とヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) を用い、腹膜モデルを作製し、GDP の1つであるメチルグリオキサール (MGO) が腹膜に与える影響を、溶質透過試験で検討した。

2. 実験方法及び理論

(1) 超音波照射による膜透過実験

水平型膜透過装置 (パームセル、VIDREX、Fig.1) の間に、H-12 3400 型血液透析器より取り出した AN69ST 膜を挟み、溶質透過試験を行った。パームセルの容積 V は 32 mL、膜面積 A は 4.91 cm^2 である。実験開始前に両セルに純水を満たし、60 分攪拌して膜を洗浄した。その後、

パームセルを大型超音波発振装置に設置し、片側にクレアチニン水溶液 (MW 113、25 mg/mL、以下 donor)、他側に純水 (以下 receptor) を満たした。温度は 27、32、37、42、47 °C とし、攪拌子回転数 1000 r.p.m. 一定で経時的にサンプリングを行った。超音波の発振周波数は 45、100 kHz とし、濃度の測定には紫外可視分光光度計を使用した。



receptor donor
Fig.1 パームセル概略

donor および receptor 溶液の物質収支から得られる

(1) 式より、総括物質移動係数 K_o [m/s] を算出した。

$$\ln(C_d(t) - C_r(t)) = \ln C_d(0) - \frac{2K_o A}{V} t \quad (1)$$

ただし、 V :体積[m³]、 A :膜面積[m²]、 t :時間[min]、 C :溶質濃度[mg/mL]、 d :donor、 r :receptor。

(2) 腹膜モデルの作製と溶質透過試験

NHDF、HUVEC の細胞懸濁液を Transwell の apical 側にそれぞれ 1.81×10^5 、 3.62×10^5 cells/mL で 0.5 mL 播種し、basal 側に培養培地を 1.5 mL 加え培養した。膜間電気抵抗値 (TER) を EVOM で測定し、TER が一定となった状態を疑似腹膜モデルの完成とした (Fig.2) [1]。

NHDF、HUVEC の腹膜モデルに MGO (0~3.0 mM : 0.0 mM は control) を 24 時間曝露させた後、蛍光デキストラン (4、10、70 kDa) を 25 $\mu\text{g/L}$ で 0.5 mL apical 側に添加した。経時的にサンプリングし、apical 側から basal 側へ移動した蛍光デキストランを、蛍光分光光度計で測定した。

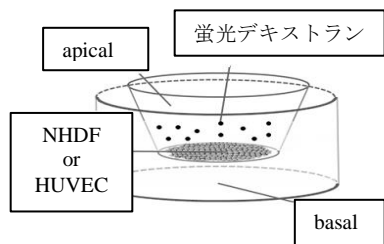


Fig.2 溶質透過試験

(2) 式より溶質透過係数 k [m/s] を算出した。

$$\ln(C_a(t) - C_b(t)) = \ln C_a(0) - \frac{4kA}{3V}t \quad (2)$$

ただし、 k :溶質透過係数[m/s]、 V :体積[m³]、 A :膜面積[m²]、 t :時間[s]、 C :蛍光デキストラン分子濃度[$\mu\text{g/L}$]、 a :apical、 b :basal。

3. 結果及び考察

(1) 超音波照射による平膜の透過促進実験

K_o はアレニウスプロットを満足した (Fig.3)。45、100 kHz の超音波照射により試験液温度は 45、100 kHz で、それぞれ +5、+2 $^{\circ}\text{C}$ となった。超音波照射なしを control とすると 100 kHz では K_o に変化は見られなかったが、45 kHz では K_o が増大した。これは超音波による透過促進効果、および、超音波による膜の崩壊が原因と思われる。超音波を照射した膜表面を、FE-SEM で観察すると、donor 側は 2 時間後、receptor 側は 5 時間後に膜表面に構造の崩壊が認められた。また、超音波照射後の中空糸型人工腎臓を用いた限外濾過実験では、アルブミン (MW 66,000) の透過が照射なしの場合に比べ増加した。したがって、超音波を適切な周波数で、適切な時間照射することで、膜型人工腎臓の溶質除去効率を向上できる可能性がある。

(2) 腹膜モデル溶質透過試験

蛍光デキストランの分子量に対する HUVEC、NHDF の溶質透過試験の結果をそれぞれ Figs.4、5 に示す。現行の腹膜透析液に含まれる MGO 濃度は 0.11 μM 以下

であるが^[2]、今回はその約 10,000 倍の濃度を添加した。その結果、MGO 傷害による溶質の透過亢進が確認できた。HUVEC、NHDF とともにデキストラン分子量の増大に伴い、 k が減少した。4 kDa の control で HUVEC、NHDF の k を比較すると、それぞれ 1.02×10^{-7} 、 1.73×10^{-7} m/s となり NHDF の方が 1.7 倍高値をとった。10、70 kDa においても同様の結果が得られた。透過亢進は、MGO により細胞の活性が低下し、細胞間の接着が弱まったためと考えられる。また、HUVEC と NHDF の差は、細胞接着に由来すると考えられる。

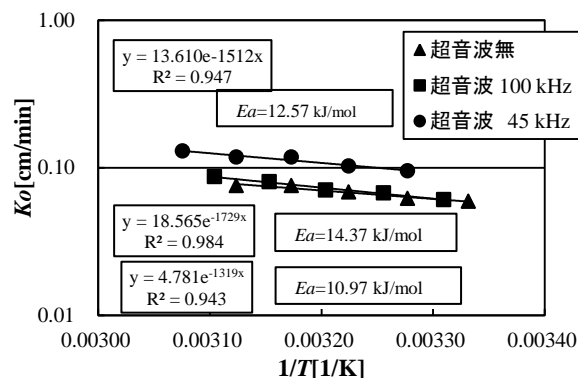


Fig.3 絶対温度の逆数に対する総括物質移動係数 K_o

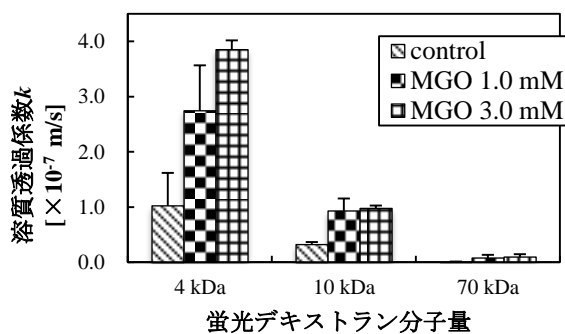


Fig.4 MGO 傷害における溶質透過係数の比較 (HUVEC)

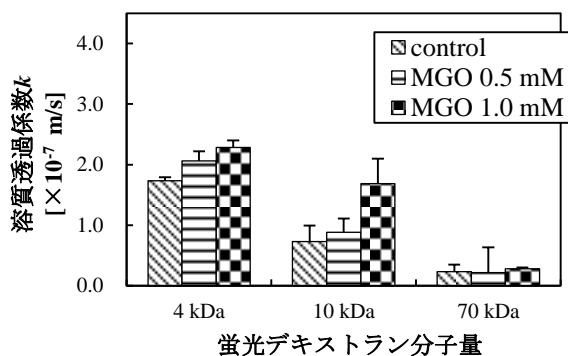


Fig.5 MGO 傷害における溶質透過係数の比較 (NHDF)

4. 結言

超音波照射により膜の崩壊が生じ溶質透過が促進した。MGO により、HUVEC、NHDF に異なる溶質透過性の亢進が確認された。

参考文献

- 1) Horiuchi T, et al., *Perit Dial Int*, 29, 217-226, 2009.
- 2) Tomo T, et al., *Perit Dial Int*, 28, 123-127, 2008.