

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560807

研究課題名（和文） 生分解性多孔質材料とナノ無機カプセルを複合化した  
環境調和型バイオ分離膜の開発研究課題名（英文） Development of environmental-benign bioseparation membranes  
by hybridizing biodegradable porous materials and nano  
inorganic microcapsules

研究代表者

田中 孝明（TANAKA TAKAAKI）

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00217043

研究成果の概要（和文）：

ポリ乳酸などの生分解性プラスチック製多孔質膜と、ヒドロキシアパタイト製ナノ粒子とを複合化させて環境調和型バイオ分離膜の開発を行った。研究代表者の田中が開発したデプスフィルター型のポリ乳酸製多孔質膜は研究分担者の木村が開発したヒドロキシアパタイトナノ粒子からなるマイクロカプセルの保持にも有効であった。モデルタンパク質として牛血清アルブミンを用いて複合化膜の吸着特性と溶出特性を検討した。

研究成果の概要（英文）：

Environmentally benign separation membranes have developed by hybridizing microporous membranes of biodegradable plastics and hydroxyapatite nanoparticles. The depth filter microfiltration membranes of poly(L-lactic acid) developed by Dr. Tanaka, the head of the research project, retained the microcapsules comprised of hydroxyapatite nanoparticles developed by Dr. Kimura, the co-researcher. The hybrid membrane of the biodegradable membrane and hydroxyapatite microcapsules adsorbed bovine serum albumin, a model protein, at a low ionic strength and eluted at an elevated ionic strength.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学，生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセパレーション

## 1. 研究開始当初の背景

バイオテクノロジー分野においては有用なタンパク質は微生物菌体・動植物細胞の培養によって生産されることが多く、培養液からの目的生産物の分離精製プロセスであるバイオセパレーションは重要である。バイオセパレーションには高度な分離性能も必要であるが、分離に伴うエネルギーや廃棄物の削減も求められている。

研究代表者の田中はこれまでバイオセパレーションの中でも特に大量の液体を取り扱い、エネルギー使用量や廃棄物量が多い菌体・細胞分離プロセスに着目し、濾過助剤を用いないクロスフロー膜濾過法の分離機構の解明や操作条件の最適化に関する研究を行ってきた。田中はこれを発展させ、海外共同研究者の米国テキサス大学オースチン校工学部 D. R. ロイド教授と協力して生分解性

プラスチック製濾過膜を作製し、使用後にコンポスト（堆肥）化処理を行うことにより廃棄物の大幅な削減が可能な濾過膜の開発を進めている。熱相分離法および非溶媒誘起相分離法を併用することにより、均一多孔質膜から非対称多孔質膜まで内部構造を制御した生分解性プラスチック製多孔質膜を作製する技術を確認しつつある。

田中は研究分担者の木村が開発したヒドロキシアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) 製マイクロカプセルが針状のナノ粒子のカプセル状集合体であり、高い比表面積や空隙率を有すること、また、ヒドロキシアパタイトはタンパク質の吸着分離に有用なことに着目した。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から、研究代表者の田中と研究分担者の木村は生分解性プラスチック多孔質膜とヒドロキシアパタイトナノカプセルを複合化したタンパク質吸着回収型分離膜を開発することを想起した。開発する分離膜はイオン交換メンブレンクロマトグラフィー膜と類似しているが、生分解性プラスチックとヒドロキシアパタイトから構成されるため、使用後にコンポスト化処理可能な環境調和型分離材料であることが特長となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 生分解性多孔質膜の作製

多孔質膜に用いる生分解性プラスチックとしては、ポリ乳酸、ポリプロラクトン、ポリブチレンサクシネートなどの生分解性ポリエステル、およびこれらのポリマーブレンドを用いた。これらの生分解性プラスチックを有機溶媒に溶解し、高分子溶液の相分離現象を利用した相分離法により、多孔質膜を製膜した。相分離法としては温度を変化させる熱誘起相分離法、高分子溶液に非溶媒を接触させる非溶媒誘起相分離法、およびこれらを組み合わせた方法を用いた。相分離の直前に高分子溶液の表面を乾燥させる方法も組み合わせる方法も検討した。

### (2) ナノ無機カプセルの作製とタンパク質吸着特性の評価

ナノ無機カプセルは W/O/W 型界面反応法により、ヒドロキシアパタイト製のナノ粒子をマイクロカプセル状に合成した。内水相にリン酸二水素カリウム水溶液、油相に油溶性界面活性剤ソルビタンモノオレエートを含むシクロヘキサン、外水相に水溶性界面活性剤ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを含む塩化カルシウム水溶液を用いた。この方法では内水相と油相の界面にヒドロキシアパタイトがカプセル状に合成される。作製したヒドロキシアパタイトマイク

ロカプセルについて、タンパク質の吸脱着特性を検討した。タンパク質としては主として牛血清アルブミンを用い、ビスシコニン酸法にて定量した。

### (3) 生分解性多孔質膜とナノ無機カプセルの複合膜およびそのタンパク質吸着特性の評価

作製した生分解性多孔質膜とヒドロキシアパタイトマイクロカプセルは、ヒドロキシアパタイトの懸濁液を生分解性多孔質膜に塗布または濾過を行うことによって複合化した。複合化膜は濾過装置に装着し、タンパク質溶液を透過させることにより、吸脱着実験を行った。吸着には主として 10 mM のリン酸緩衝液に溶解した牛血清アルブミンを用い、脱着（溶出）には 800 mM のリン酸緩衝液を用いた。

### (4) 膜の分解性の評価

作製した膜の分解特性は、25 °C および 60 °C の湿潤条件下で保持した後、卓上型引張試験機を用いて測定した破断伸びにより評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ナノ無機カプセルの作製とタンパク質吸着特性の評価

図 1 に作製したヒドロキシアパタイトマイクロカプセルの走査型電子顕微鏡写真を示す。ヒドロキシアパタイトナノ粒子が直径 5-15  $\mu\text{m}$  のカプセル状に合成されていた。

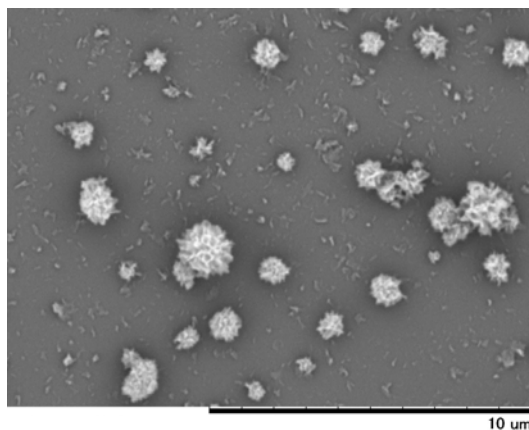


図 1 ヒドロキシアパタイトマイクロカプセル

このヒドロキシアパタイトマイクロカプセルのタンパク質吸着特性を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した牛血清アルブミン溶液を用いて検討したところ、タンパク質濃度 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶液中で 2500  $\mu\text{g}/\text{g}$ -HA までは、ほぼ 100% 吸着できた。マイクロカプセルを構成する針状のヒドロキシアパタイトナノ粒子がマイクロカプセルの表面積を大きくするため、高いタンパク質吸着性を示したと考えられた。吸着した牛血清アルブミン

を 800 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) にて 75% 以上溶出できることも示された。

## (2) 複合化用生分解性多孔質膜の検討とナノ無機カプセルの複合化

ヒドロキシアパタイトマイクロカプセルを複合化する生分解性多孔質膜として、種々の生分解性プラスチック膜を検討したが、ポリ乳酸製多孔質膜が利用しやすいことを分かった。現在のところ、ジメチルスルホキシドを溶媒とし、熱誘起相分離法と非溶媒誘起相分離法を組み合わせることで製膜したデブフィルター型ポリ乳酸製多孔質膜が、作製したヒドロキシアパタイトマイクロカプセルの複合化に有効なことを示している。図 2 に塗布法にて複合化した例の断面写真を示す。図 2 の写真では断面を観察するときの切断操作のために膜が 2 枚に分かれているが、2 枚のポリ乳酸製多孔質膜の間にヒドロキシマイクロカプセルが複合化されていた。

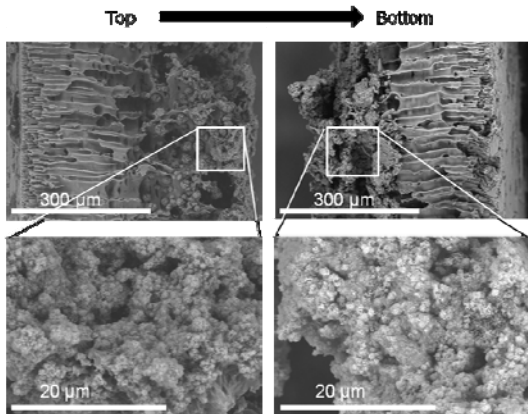


図 2 ヒドロキシアパタイトマイクロカプセルを複合化したポリ乳酸製多孔質膜

## (3) 複合化膜のタンパク質の吸脱着特性

複合化膜を用いてタンパク質の吸脱着実験を行った。図 3 にその実験例を示す。10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に 20 μg/mL になるように溶解した牛血清アルブミン溶液を用い、複合化膜を循環させて吸着を行ったところ、90%のタンパク質が吸着した。これを 10 mM リン酸緩衝液で洗浄したときにはタンパク質の溶出は見られなかったので十分に吸着できていると考えられる。その後、複合化膜に 800 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.8) を透過させるとタンパク質が溶出した。このように作製した複合化膜はタンパク質の吸脱着特性を有することが示された。当初、タンパク質の回収率が低かったため、イオン強度や流速などを変化させて検討したところ、一部改善された (図 2)。今後、緩衝液のイオン強度や pH などをさらに最適化することにより、

さらに回収率を高められると考えられる。

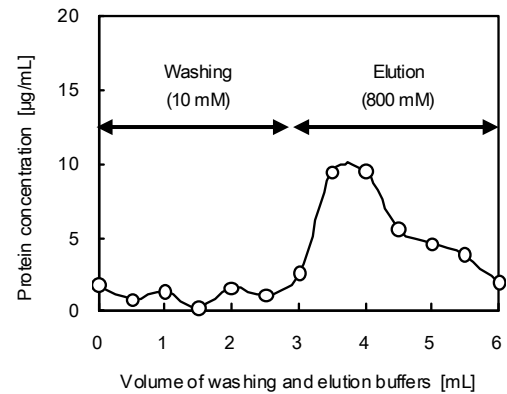


図 3 ヒドロキシアパタイトマイクロカプセルを複合化したポリ乳酸製多孔質膜による牛血清アルブミンの吸脱着

## (4) 膜の分解特性

作製した複合膜の分解特性について、ポリ乳酸膜の分解実験により評価した。25 °C および 60 °C の湿潤条件下にて 3 週間保持し、引張試験を行った。25 °C では 3 週間後でも初期の 2 分の 1 程度の破断伸びを有していたのに対し、コンポスト化処理などで用いられる 60 °C においては、1 週間で破断伸びが 13 分の 1 に低下した。

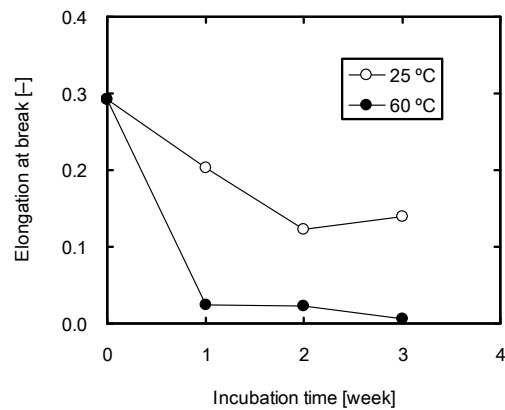


図 4 ポリ乳酸製多孔質膜の分解特性

これらの結果から、このポリ乳酸膜とヒドロキシアパタイトマイクロカプセルを複合化した分離膜はコンポスト化処理を行うと、急激に崩壊すると予想される。コンポスト化装置内では分解微生物の分泌する酵素により、ポリ乳酸の分解がさらに促進されると考えられる。ヒドロキシアパタイトマイクロカプセルについては、ヒドロキシアパタイトは骨の成分であり、10 μm オーダーのマイクロ

カプセルではあるが、コンポジットの無機成分として問題ないと考えられる。

#### (5) 本研究の意義・インパクトと今後への展望

本研究の結果、ナノ無機粒子からなるヒドロキシアパタイトマイクロカプセルをポリ乳酸製多孔質膜に複合化することにより、タンパク質を吸着可能な分離膜が開発できることを示せた。このような生分解性を有する有機・無機複合型の吸着膜は、バイオプロセスに伴う産業廃棄物の削減を可能とするため、環境に優しいバイオセパレーション分離材料として将来必要になると考えられる。今後の展望としては、他のタンパク質の吸着や溶出条件を確立することにより、ポリ乳酸-ヒドロキシアパタイト-複合化膜は、広い応用が可能となると考えられる。本研究課題の期間は終了したが、研究代表者らは関連研究を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① 田中孝明, 生分解性プラスチック製多孔質材料の開発 - <多孔質構造の制御と孔を利用した材料の複合化>, プラスチックス, 査読無, 63巻4号, 2012, 58-62
- ② T. Tanaka, T. Nishimoto, K. Tsukamoto, M. Yoshida, *et al.*, Formation of depth filter microfiltration membranes of poly(L-lactic acid) via phase separation, *Journal of Membrane Science*, 査読有, Vol. 396, 2012, 101-109
- ③ 田中孝明, 生分解性プラスチックを素材とした多孔質膜の開発と応用, ファインケミカル, 査読無, 40巻8号, 2011, 30-36
- ④ T. Tanaka, M. Ueno, Y. Watanabe, T. Kouya, *et al.*, Poly(L-lactic acid) microfiltration membrane formation via thermally induced phase separation with drying, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 査読有, Vol. 44, 2011, 465-475
- ⑤ T. Tanaka, M. Takahashi, S. Kawaguchi, T. Hashimoto, *et al.*, Formation of microporous membranes of poly(1,4-butylene succinate) via nonsolvent and thermally induced phase separation, *Desalination and Water Treatment*, 査読有, Vol. 17, 2010, 176-182
- ⑥ T. Tanaka, T. Aoki, T. Kouya, M. Taniguchi, *et al.*, Mechanical properties of microporous foams of biodegradable plastic, *Desalination and Water Treatment*, 査読有, Vol. 17, 2010, 37-74
- ⑦ 田中孝明, 高屋朋彰, 谷口正之, バイオマ

プラスチック製濾過膜の開発と応用, ケミカルエンジニアリング, 査読無, 55巻, 2010, 101-107

[学会発表] (計3件)

- ① 寺口一樹, 多田晋一郎, 谷口正之, 田中孝明, ヒドロキシアパタイト複合化膜の開発とタンパク質吸着特性の評価, 化学工学会第43回秋季大会, P2D05, 名古屋, 2011年9月15日
- ② T. Takaaki, T. Nishimoto, T. Kouya, *et al.*, 2010 AIChE Annual Meeting, 84d, Salt Lake City, USA, 2010年11月8日
- ③ 多田晋一郎, 高屋朋彰, 谷口正之, 田中孝明, ポリ乳酸-ヒドロキシアパタイト-複合膜, 化学工学会第42回秋季大会, WIP37, 京都, 2010年9月6日

[図書] (計1件)

- ① 田中孝明, 他, 植物由来ポリマー・複合材料の開発, サイエンス&テクノロジー, 2011, pp. 203-209

[その他]

ホームページ等

[http://tctanaka.eng.niigata-u.ac.jp/top\\_e.html](http://tctanaka.eng.niigata-u.ac.jp/top_e.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 孝明 (TANAKA TAKAAKI)  
新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：00217043

##### (2) 研究分担者

木村 勇雄 (KIMURA ISAO)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：00169921