

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04177

研究課題名(和文) タンパク分画用低ファウリング膜の開発と応用

研究課題名(英文) Development of low-fouling membrane for classification of proteins and its application

研究代表者

中尾 真一 (Nakao, Shin-ichi)

工学院大学・先進工学部・教授

研究者番号：00155665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパクの分画は、医療・創薬分野や食品分野で重要な技術であり、膜を用いた手法が有望視されているが、膜が汚れるファウリングが問題となっている。本研究では、プラズマグラフト重合法を用いて、タンパク溶液を処理してもファウリングしない膜の開発を行った。本手法は高分子系平膜に対しても中空糸膜に対しても有効であった。さらに分子量の異なるデキストラン、および各種タンパクを用いて、開発膜の分画分子量を測定し、タンパク分画の実現可能性を示した。

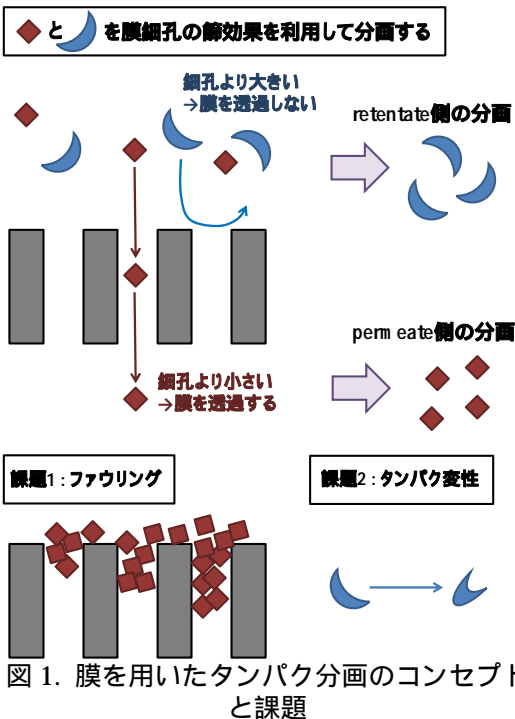
研究成果の概要(英文)：The classification of proteins is an important technique in the medical and pharmaceutical field, however fouling remains a critical issue to be solved. In this study, we successfully developed low-fouling membranes against proteins by employing the plasma graft polymerization method. The developed technique was effective for the polymeric flat-sheet membranes as well as hollow-type membranes. Furthermore, molecular weight cut-offs of the developed low-fouling membranes were successfully estimated with using dextrans and proteins.

研究分野：膜工学

キーワード：化学工学 膜 ファウリング

1. 研究開始当初の背景

タンパクの分画は、医療・創薬分野や食品分野で重要な技術であり、等電点などのタンパクの物理的性質に着目した分画方法が、国内外でいくらか提案されている。これに対し、膜細孔の篩効果(膜細孔より小さな溶質は膜を透過し、大きな溶質は膜を透過しない)を利用した、シンプルな分画法の確立が期待されている(図 1)。しかし、タンパクを含む水溶液を膜で処理すると、タンパクが膜面や細孔内部に付着・吸着する「ファウリング」が必ず生じる。ファウリングが起こると、有効に機能する膜細孔面積が減少し、篩効果を利用した分画はできなくなる。さらに膜で分画し回収するタンパクが変性してはならないが、膜との相互作用によりタンパクはしばしば変性する。これらの問題の解決が極めて難しく、膜を用いたタンパク分画手法に対する期待は大きいものの、実用的な利用には至っていない。たとえば医療分野における膜利用は、血液透析や血液濾過といった腎不全治療への適用例がよく知られているが、上記の課題の本質的解決には到達していない。



研究代表者らは、これまでに膜細孔の篩効果を利用した粒子分級法の開発にも取り組んできた。その結果、粒径が 100 nm ~ 10 μm の範囲で分布する多分散粒子に対し、用いる膜の細孔に対応した、単分散な分画を得ることに成功している。ただし、タンパクと比較して対象系の大きさが 1 ケタ以上大きく、分子量が 1 万 ~ 100 万程度のタンパクに対しての有効性は明らかとなっていなかった。また、我々のグループでは、透析や血漿分画などの医療分野での膜利用に関する研究を行ってきた。豊富な知見とノウハウを有するが、血中タンパクによる膜のファウリングや、膜

処理後のタンパクの変性といった課題を抱えていた。

2. 研究の目的

本研究では、高分子系平膜・中空系膜に対し、ペタイン系ポリマーやノニオン系ポリマーを膜面および細孔内部に固定することで、タンパクのファウリングを防止可能な膜を作製し、タンパク分画への適用可能性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プラズマグラフト重合法を用いた低ファウリング膜の開発

プラズマグラフト重合法は、プラズマ処理により有機物を活性化し、この活性点を足がかりにビニル基をもつモノマーを重合する手法である。基材となる精密ろ過膜に対し、アルゴン 10 Pa 雰囲気下でプラズマ照射を行い、活性点を生成した。その後、空気に接触させ、活性点をパーオキシド基に変換した。直ちに凍結脱気を繰り返した所定濃度のカルボキシメチルペタイン(CMB)モノマー、または 2-メトキシエチルアクリレート(MEA)モノマー溶液を添加すると同時に 80 の水浴中に保持することで、パーオキシド基の開裂を促し、グラフト反応を進行させた。モノマー溶液の溶媒は 20%または 50%メタノール水溶液を用いた。プラズマ照射条件は 10 W または 30 W, 60 秒、グラフト反応条件は 80 とし、重合時間は変化させた。この膜をエタノールおよび純水を用いて繰り返し洗浄し、真空乾燥後、重量変化分析、FT-IR 分析、FE-SEM 分析を行い、膜のキャラクタリゼーションとした。重量変化分析には、以下の式で定義した重合量を用いた。

重合量 $[mg\ cm^{-2}] = m [mg] / S [cm^2]$
ここで、 m は重合前後の膜重量変化、 S は膜面積である。

(2) 開発膜の低ファウリング性評価

自作の流通型膜評価装置を用い、(i)純水、(ii)牛血清アルブミン(BSA)水溶液の透過試験を行った。原液に(i)純水を用いる場合は、純水フラックスの圧力依存性を評価した。(ii)BSA 水溶液を用いる場合は、定常フラックスを測定し、開発膜の低ファウリング性を評価した。

(3) 開発膜のタンパク分画への適用可能性評価

(2)と同様の膜評価装置を用い、分子量の異なるデキストランと、各種タンパク(パピイン、ペプシン、 α -アミラーゼ、BSA)水溶液の透過試験を行った。見かけの阻止率を測定し、分画曲線から分画分子量を推定した。本研究では分画分子量は、阻止率が 0.90 となる分子量と定義した。

4. 研究成果

(1) プラズマグラフト重合法を用いた低ファウリング膜の開発

平膜・中空糸膜の形状にかかわらず, CMB・MEA いずれもプラズマグラフト重合法で固定することができた. また重合時間が長いほど, 重合量が大きくなる傾向が確認された. 一例として, 中空糸膜 30 本に対して MEA を一括重合したときの ATR 法による IR スペクトルを図 2 に示す. 一番下のスペクトルが未処理の基材中空糸膜, それ以外は重合膜のスペクトルであり, 重合膜にはいずれも MEA に由来するピークが 1730cm^{-1} 付近に認められる.

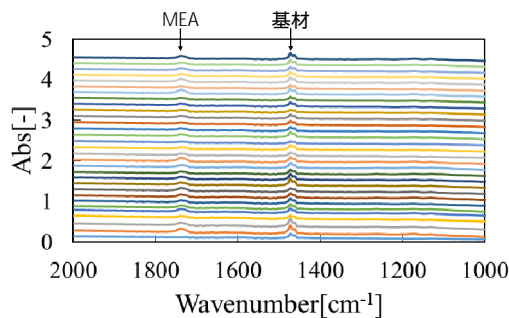


図 2. 開発膜の FT-IR スペクトル

また FE-SEM 分析により, 膜面がポリマーで修飾され, 重合量が大きな場合は細孔が閉塞している様子も確認された.

(2) 開発膜の低ファウリング性評価

一例として, 中空糸状膜の MEA ポリマーを重合したもの(重合量 0.26 mg cm^{-2})と未処理膜に対し, 200ppm の BSA 水溶液を原液とした透過試験を行ったときの, フラックスの経時変化を図 3 に示す. フラックスは初期フラックスで規格化している. 未処理膜を用いた場合は, フラックスが急激に低下しており, ファウリングが進行していることが分かる. 一方で開発膜を用いた場合は, フラックスは低下しているものの, 未処理膜と比較して高いフラックスを維持しており, 開発膜の低ファウリング性が認められた.

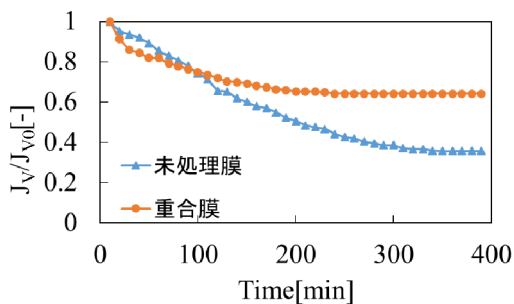


図 3. 未処理膜および重合膜を用いたときの BSA 水溶液透過試験のフラックス変化

また平膜でも同様の実験を行い, 開発膜の低ファウリング性を確認した. さらに開発膜のファウリングは, 純水洗浄や次亜塩素酸洗

浄が, 未処理膜と比べて効果的であることも明らかにした.

(3) 開発膜のタンパク分画への適用可能性評価

一例として, CMB 重合膜のデキストランを用いた分画分子量曲線を図 4 に示す.

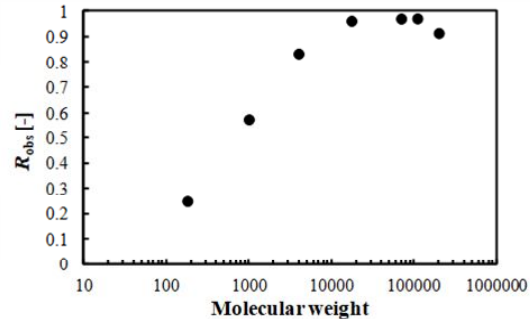


図 4. 分画分子量曲線(重合量 0.083 mg cm^{-2})

デキストラン分子量が大きくなると阻止率が大きくなっている. また阻止率が 0.90 になる分子量は, データ補間を行い, 8,600 と推定できる. 分画分子量と重合量の関係を図 5 に示す.

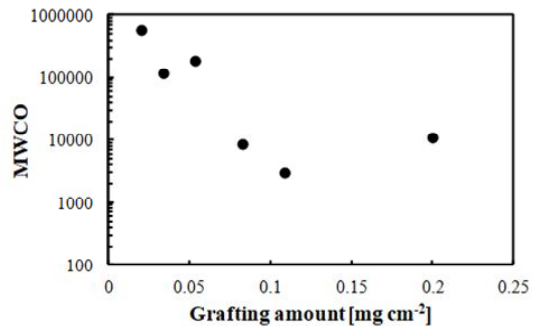


図 5. 重合量と分画分子量の関係

重合量が大きくなると分画分子量が小さくなり, 重合量が 0.1 mg cm^{-2} を超えると, ほぼ一定となることが分かる. すなわち, 重合量によって, 膜の分画分子量を制御できることを示している.

分画分子量はタンパクを用いても評価した. 一例として, 重合量 0.033 mg cm^{-2} の膜では 65,000, 重合量 0.043 mg cm^{-2} の膜では 51,000 であった. すなわちこの程度の重合量の膜を用いることで, タンパクの分画が可能となることを示している.

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 3 件)

Kazuki Akamatsu, Wataru Noto, Hiroyuki Fukuzawa, Akiko Hara, Shinichi Nakao, Grafting of carboxybetaine polymers to polyethylene membranes via plasma graft polymerization to improve low-fouling properties and to tune the molecular weight cut-off, Sep. Purif.

Technol., 査読有, in press. DOI 10.1016/j.seppur.2018.05.004
Kazuki Akamatsu, Keita Ishizaki, Shotaro Yoshinaga, Shin-ichi Nakao, Mass Transfer Coefficient of Tubular Ultrafiltration Membranes under High-Flux Conditions, AIChE J., 査読有, 64(5) 1778-1782 (2018) DOI 10.1002/aic.16052
Jun Murakami, Iwakazu Kaneko, Naoki Kimata, Michio Mineshima, Takashi Akiba, Problems in the evaluation of polyvinylpyrrolidone (PVP) elution from polysulfone membrane dialyzers sterilized by gamma-ray irradiation. Renal Replacement Therapy, 査読有, 2016 ; 2 : 36. DOI 10.1186/s41100-016-0047-x

〔学会発表〕(計 7 件)

赤松憲樹, 能登渉, 福澤博之, 中尾真一, カルボキシメチルペタインを用いた低ファウリング限外ろ過膜の分画特性, 膜シンポジウム 2017, 2017 年 11 月 14 日, 富山
赤松憲樹, 高分子成分・粒子状成分のファウリング現象の理解に向けたアプローチ, SNAP 研究会 2017 年度事例研究会(招待講演) 2017 年 11 月 10 日, 東京
赤松憲樹, 能登渉, 福澤博之, 中尾真一, プラズマグラフト重合法を用いた低ファウリング限外ろ過膜の開発, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017 年 9 月 21 日, 名古屋
赤松憲樹, 高分子成分・粒子状成分のファウリング, 第 39 回高分子と水・分離に関する研究会(招待講演) 2017 年 6 月 22 日, 東京
赤松憲樹, クロスフロー精密ろ過における粒子ファウリングの抑制, 膜ファウリング研究会(招待講演) 2017 年 1 月 24 日, 広島
Michio Mineshima, Kei Eguchi, Clinical effectiveness of Intermittent Infusion Hemodiafiltration (IIHDF) using backfiltration of ultrapure dialysis fluid compared with Predilution On-line Hemodiafiltration: A prospective, multicenter and controlled trial. American Society of Nephrology 2016 Renal Week. November 15-20, 2016 Chicago
赤松憲樹, 水処理における膜技術とファウリング抑制, 第 85 回武蔵野地区高分子懇話会(招待講演) 2016 年 11 月 19 日, 東京

〔図書〕(計 1 件)

Michio Mineshima, Optimal design of

the dialyzers. Scientific Aspects of Dialysis Therapy, JSDT/JSFA Anniversary Edition, Contributions to Nephrology Vol.189, pp.204-209, KARGER, 2017

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
www.ns.kogakuin.ac.jp/~wwb1051/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 真一 (NAKAO, Shin-ichi)
工学院大学・先進工学部・教授
研究者番号: 00155665

(2) 研究分担者

峰島 三千男 (MENESHIMA, Michio)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50166097

研究分担者

赤松 憲樹 (AKAMATSU, Kazuki)
工学院大学・先進工学部・准教授
研究者番号: 50451795

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし