

イオン交換基を有するグラフト高分子鎖を
利用した高性能タンパク質分離膜の開発

常田 聡

イオン交換基を有するグラフト高分子鎖を 利用した高性能タンパク質分離膜の開発

常田 聡

目次

本研究の目的および本論文の構成	1
-----------------	---

第1章 緒論

1-1 放射線グラフト重合法	4
1) 放射線グラフト重合法の特徴	
2) 放射線グラフト重合法の分類	
3) 放射線グラフト重合法の利点	
1-2 グラフト鎖のキャラクタリゼーション	6
1) 単離法によるグラフト鎖の分子量の測定	
2) 透過流束値からのグラフト鎖の特性の推察	
1-3 放射線グラフト重合法によるイオン交換体の合成	7
1) イオン交換樹脂の合成法	
2) 放射線グラフト重合法を利用したイオン交換基の導入法	
1-4 イオン交換体によるタンパク質の分離精製	8
1) バイオ生産物の分離精製	
2) イオン交換クロマトグラフィー	
3) メンブレンクロマトグラフィーとパーフュージョンクロマト グラフィー	

第2章 スルホン酸基を有するグラフト鎖の高分子基材への付与

2-1 緒言	18
2-2 実験	19
1) 基材と試薬	
2) 放射線グラフト重合	
3) 単独グラフト重合	
4) 二段グラフト重合	

5)	共グラフト重合	
6)	ESR測定	
7)	膨潤度の測定	
2-3	結果と考察	22
1)	単独グラフト重合	
2)	二段グラフト重合	
3)	共グラフト重合	
4)	いろいろな形状の基材への適用	
2-4	結 言	27
第3章 イオン交換基を有するグラフト鎖のコンフォメーションの実験的解明		
3-1	緒 言	46
3-2	実 験	48
1)	DEA基を有する多孔性膜の合成	
2)	DEA膜の物性	
3)	DEA膜の透過流束	
4)	DEA膜の見かけの細孔径の推算法	
3-3	結果と考察	50
1)	DEA膜の合成	
2)	アモルファス部に形成したグラフト鎖の性質	
3)	細孔表面部に形成したグラフト鎖の性質	
4)	架橋構造をもったグラフト鎖の性質	
5)	グラフト鎖の伸縮の可逆性	
3-4	結 言	54
第4章 スルホン酸基を有するグラフト鎖の金属イオンおよびタンパク質吸着特性		
4-1	緒 言	74
4-2	実 験	75
1)	基材と試薬	

2)	基材へのスルホン酸基導入法	
3)	スルホン酸基を有する膜の物性	
4)	透過法によるタンパク質の吸着実験	
5)	透過法による銅イオンの吸着実験	
4-3	結果と考察	77
1)	スルホン酸基を有する膜の物性	
2)	SP膜によるリゾチームおよび銅イオンの吸着	
3)	SP膜およびSS膜のリゾチーム吸着性能の比較	
4)	膜の親水化による非選択的吸着の抑制	
4-4	結 言	81

第5章 イオン交換基を有するグラフト鎖へのタンパク質のTentacle吸着

5-1	緒 言	98
5-2	実 験	100
1)	基材と試薬	
2)	テンタクル型イオン交換膜の合成法	
a)	放射線グラフト重合	
b)	テンタクル型カチオン交換膜の合成	
c)	テンタクル型アニオン交換膜の合成	
3)	テンタクル型イオン交換膜の物性	
4)	透過法によるタンパク質の吸着実験	
5-3	結果と考察	103
1)	SS-Diol膜およびDEA-EA膜の合成	
2)	SS-Diol膜およびDEA-EA膜の物性	
3)	SS-Diol膜およびDEA-EA膜によるタンパク質の吸着	
4)	圧力損失によるテンタクル吸着の検証	
5)	各種タンパク質のテンタクル吸着	
5-4	結 言	107

第6章 Tentacle吸着の物理化学的特性および実用性

6-1	結 言	123
6-2	実 験	125
	1) 基材と試薬	
	2) DEA-EA膜の合成および物性	
	3) 透過法によるBSAの吸着および溶出実験	
6-3	結果と考察	126
	1) DEA-EA膜によるBSAの吸着および溶出挙動	
	2) DEA-EA膜のBSA吸着性能の耐久性	
	3) DEA-EA膜のBSA吸着平衡関係	
	4) DEA-EA膜のBSA吸着性能における外部パラメータ依存性	
	5) Tentacle型イオン交換膜とイオン交換ビーズの比較	
6-4	結 言	131

第7章 本研究の総括と今後の展望

7-1	各章の要約	153
7-2	本研究の総括	157
7-3	今後の展望	158

本研究の目的および本論文の構成

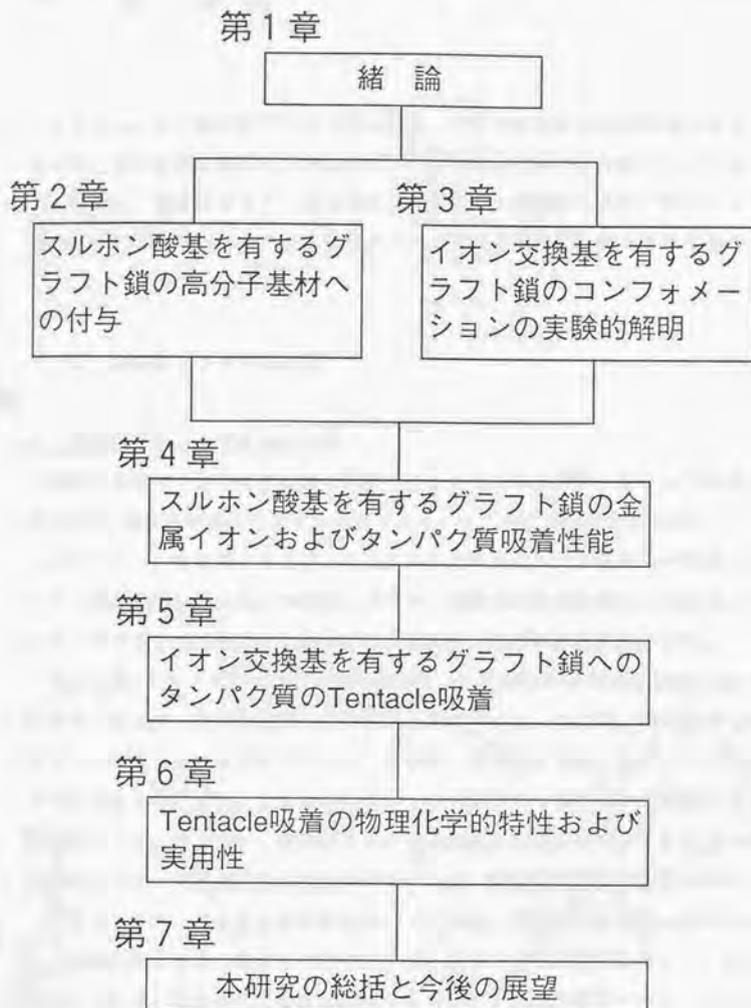
タンパク質は極性を持ち、荷電し得るので、電荷の違いを利用したイオン交換による分離が可能である。イオン交換クロマトグラフィーによるバイオ生産物の分離精製がさかんにおこなわれている。カラムに充填されるイオン交換ビーズは、サイズの大きいタンパク質が入り込める細孔構造、および非特異的な不可逆的吸着が少ない親水性の表面構造をもっている。タンパク質のビーズ内部での移動は濃度勾配を駆動力とした拡散である。そのため、総括の吸着速度は、ビーズ内部でのタンパク質の拡散速度に支配されるという欠点をもっている。これに対し、タンパク質が通過できる細孔を有する膜の細孔表面にリガンドを固定し、そこへタンパク質を含む溶液を強制的に透過させるシステム、すなわちメンブレンクロマトグラフィーが提案された。このとき、タンパク質の拡散移動抵抗が無視できるので、クロマトグラムが透過流量に依存しないという吸着特性を持ち、タンパク質を高速かつ選択的に吸着することができる。

高分子材料を修飾して機能を付与するとき、放射線グラフト重合法は、適用できる基材の形状、材質が広範囲であることから有力な手法である。放射線グラフト重合法を用いて、直径約 $0.3\mu\text{m}$ の細孔を有するポリエチレン製精密濾過膜の細孔表面に、グラフト高分子鎖を付与することにより、高性能な分離機能性材料を開発する研究が進められてきた。キレート形成基やアフィニティリガンドをグラフト鎖に導入することによって、液中に低濃度で溶存する金属イオンやタンパク質を細孔内を通過する間に捕捉できる。

本研究では、放射線グラフト重合法を適用して、イオン交換基を有するグラフト鎖を精密濾過膜に付与し、タンパク質を分離精製するための新規の膜を開発することを目的としている。従来のイオン交換ビーズでは、架橋構造をもつ高分子担体に直接イオン交換基が固定されていたのに対し、本研究では、グラフト鎖という非架橋のフレキシブルな高分子鎖にイオン交換基を固定する。この新規な吸着場にタンパク質がイオン交換吸着するときの吸着平衡や吸着速度についての基礎研究もおこなう。

本論文は7章で構成される。構成図を次図に示す。第1章では、本研究の意義を明確にするために、放射線グラフト重合法、イオン交換体の合成法について述べ、さらにイオン交換を利用したタンパク質分離精製法の現状についてまとめた。第2章では、イオン交換基を有するビニルモノマーを利用した放射線グラフト重合法によるイオン交換体の新規合成法について述べる。第3章では、膜の透水性能を利用して、イオン交換基を有するグラフト鎖のコンフォメーションについて考察する。第4章では、スルホン酸基を有するグラフト鎖を多孔性膜に導入し、金属イオンおよびタンパク質の吸着性能を調べ、比較する。第5章では、イオン交換基を有するグラフト鎖へのタンパク質の多層吸着構造（テentakル吸着構造）について実験的解明をおこなう。第6章では、テentakル吸着を発現するグラフト鎖を多孔性膜に付与した膜材料（“Porous & Tentacle”型イオン交換膜）のタンパク質吸着特性を調べ、実用化への可能性を考察する。第7章では、本研究全体の総括および今後の展望を述べる。

本論文の構成



第1章 緒論

本章では、まず放射線グラフト重合法についてその原理および特徴を紹介する。つぎに、高分子基材に導入されたグラフト鎖の特性を調べる方法についてまとめる。さらに、放射線グラフト重合法によってイオン交換基を基材に導入する方法を提案し、得られたイオン交換体をタンパク質の分離精製に適用する意義を示す。

1-1 放射線グラフト重合法

1) 放射線グラフト重合法の特徴

現存する高分子材料に放射線を照射すると、そのエネルギーによって高分子材料中のC-H結合が切れてラジカルができる。そこへ二重結合をもつモノマー（ビニルモノマー）を接触させると、ラジカルを開始点として重合反応が開始し、ポリマー鎖が成長していく。やがて、ポリマー鎖間での水素のやりとりあるいはポリマー鎖どうしの結合によってラジカルが消失して重合反応が停止する。

Fig. 1-1にグラフト重合法の模式図を示す。もとの高分子材料を基材あるいは幹ポリマーとよび、基材に重合したポリマーを枝ポリマーとよぶ。幹に枝をつけるので、この重合のさせ方をグラフト（接ぎ木）重合法とよぶ。枝ポリマーをグラフト鎖ともよぶ。また、放射線を利用してラジカルつくるので、放射線グラフト重合法という。プラズマ、紫外線あるいは化学物質を利用してラジカルをつくる方法もあるが、材料合成の工業化を考えたとき、放射線の利用が有利である。

グラフトとは、もともと農芸手法の一つである。寒さに耐えるしっかりした幹に、おいしい果実をつける枝を接ぎ木する。こうして寒冷地でもおいしい果実がなるのである。幹と枝のこの役割分担こそグラフト手法の魅力である。形状もった強度のある高分子材料、すなわち幹ポリマーに、分離あるいは反応機能をもった枝ポリマーをグラフトできる。こうして高性能な材料を開発する。

2) 放射線グラフト重合法の分類

放射線グラフト重合法を分類する基準は、(1)放射線源、(2)照射時期および(3)モノマーの相である。まず、基材にラジカルをつくるエネルギー源として、電子線(EB)とガンマ線(γ 線)とがある。つぎに、基材とモノマーを共存させておいて、そこへ放射線を照射する同時照射法と、基材に放射線を照射した後に、モノマーを接触させる前照射法とがある。同時照射法では、モノマーによっては、基材へのグラフト重合と並行して、モノマーどうしの重合が進み、ホモポリマーの生成が起こることがある。一方、前照射法では、照射工程とグラフト重合工程とを分けられるので実用上、とても便利である。さらに、反応させるモノマーをラジカルへ液として輸送する液相法と蒸気として輸送する気相法とに分けられる。前照射気相法なら、照射基材に重合させたい量のモノマーを用意して、モノマーがなくなるまで反応をおこなえばよい。ただし、気相のモノマー濃度に分布がないように反応装置に工夫をしないと、得られるグラフト材料に重合反応率の不均一な分布が生じる。一方、前照射液相法では、反応時間、反応温度を制御して重合反応率を決定する。ホモポリマーを除去するために、グラフト重合反応後に、グラフト材料をよく洗浄する必要がある。ただし、重合反応率の分布は少ない。

3) 放射線グラフト重合法の利点

放射線グラフト重合法はつぎの点で有利である。

- (1) いろいろな材質の高分子材料を基材として利用できる点。例えば、セルロース、ポリオレフィン、ポリテトラフルオロエチレンを利用できる。
- (2) いろいろな形状の高分子材料を基材として利用できる点。例えば、フィルム、中空糸膜、繊維、不織布、ビーズへ適用できる。
- (3) いろいろな分布や形態のグラフト鎖を基材へ付与できる点。フィルムの厚さ全体に、あるいは表面付近のみにグラフト鎖を付与したり、多孔性材料の内部孔のまわりに、あるいはそのマトリクス内にグラフト鎖を付与したりできる。

さらに、触媒が不要であること、穏和な反応条件で重合を進行させることができる点が利点としてあげられる。

これらの利点を活かして、これまで放射線グラフト重合法により、イオン交換膜 (Ishigaki et al., 1981; Ellinghorst, 1983)、キレート樹脂 (Omichi et

al., 1987)、海水ウラン採取用吸着剤 (Okamoto et al., 1985; Saito et al., 1988; Uezu et al., 1988)、生物活性体の固定化材料 (Kaetsu & Kumakura, 1987)、抗血栓性材料 (Hoffman et al., 1983; Hayashi et al., 1987) など多くの機能材料が研究開発され、このうちイオン交換膜は電池用隔膜として工業化されている (Tanso, 1986)。脱臭材についても企業化されつつある (Ogawara & Saito, 1993)。

1-2 グラフト鎖のキャラクタリゼーション

放射線グラフト重合法によって基材に導入されたグラフト高分子鎖の特性を調べる方法は、直接法と間接法とに分けることができる。直接法とは、グラフト鎖を基材から単離して、その分子量分布を決定する方法であり、間接法とは、基材に固定された状態でグラフト鎖が示す動的あるいは静的挙動からそのイメージをつくる方法である。ただし、実用材料をつくるときには、もともと化学的に安定な高分子材料を基材に選ぶことが多いので、グラフト鎖を単離するという直接法がいつも適用できるとは限らない。

1) 単離法によるグラフト鎖の分子量の測定

Yamagishi et al. (1993) は、セルローストリアセテート製の微多孔性膜に、メチルメタクリレート (MMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$) をグラフト重合した。熱硫酸による基材の加水分解によってMMAグラフト鎖を単離し、その分子量分布をゲルパーミエーションクロマト (GPC) 法で調べた。MMAグラフト鎖の重量平均分子量は 10^6 程度であった。MMAモノマーの分子量が100であるので、モノマー単位として 10^4 個分に相当する。このグラフト鎖が伸長したコンフォメーションをとる場合、 $1\mu\text{m}$ 程度の長さになる。これは精密濾過用の微多孔性膜の孔径に相当する。

2) 透過流束値からのグラフト鎖の特性の推察

Yamagishi et al. (1988) は、気相および液相グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン膜に各種のビニルモノマーをグラフト重合し、それぞれの膜の透

過流束を比較した。その結果、同一量のグラフト鎖をもつ膜同士で比較した場合、気相でグラフト重合した膜の方が液相でグラフト重合した膜よりも高い透過流束を示した。これは、気相中でのモノマーの拡散速度が液相中に比べて速いため、重合反応中に基材のマトリクス内に形成するグラフト鎖の割合が多く、細孔を埋めるグラフト鎖の割合が少ないからである (Yamagishi et al., 1990)。前照射法と同時照射法についても、膜の透過流束値からグラフト鎖の形成部位が異なることが確認されている (Yamagishi et al., 1991)。

グラフト鎖に含まれる官能基の種類や密度によっても膜の透過流束は大きく異なる。これは、グラフト鎖のコンフォメーションが異なるためである。特に、イオン解離基を有するグラフト鎖を多孔性膜に導入した場合、官能基密度の増加にともない膜の透過流束は大きく低下する (Saito et al., 1989a)。また、透過流束は膜に透過させる溶液の性質にも大きく依存する。たとえば、リン酸基をもつグラフト鎖を導入した膜では、純水の透過流束はほとんど零であるが、2MのNaCl水溶液を透過させると透過流束は約7倍大きくなる (Saito et al., 1989b)。このようにグラフト鎖のコンフォメーションは、グラフト鎖と透過溶液の両方の性質に依存する。

1-3 放射線グラフト重合法によるイオン交換体の合成

1) イオン交換樹脂の合成法

イオン交換樹脂の用途は、純水製造、硬水軟化、金属回収および触媒である。最近では、生物学、医学、農学の分野でも使用されている。従来のイオン交換樹脂の多くはスチレンとジビニルベンゼンの共重合体にイオン交換基を導入したものである。カチオン交換基であるスルホン酸基を導入するには、濃硫酸、クロロ硫酸中での高温、長時間の反応という極めて苛酷な条件が必要である (Wheaton & Lefevre, 1981; Albright & Yarnell, 1987)。そのため基材の化学的劣化、物理的強度の低下、低分子溶出物の発生などの問題が生じている。また、スルホン化反応に耐えることができるように架橋を施された基材は成型が非常に困難であるため、その形状は、球状あるいはそれを微細化した粉末状である。

2) 放射線グラフト重合を利用したイオン交換基の導入法

高分子材料にイオン交換基を付与するとき、放射線グラフト重合法は、適用できる基材の形状、材質が広範囲であることから有力な手法である。成型性がよく、物理的にも化学的にも安定な高分子であるポリエチレンに、放射線グラフト重合法を用いてスルホン酸基(-SO₃H)を導入する方法をFig. 1-2に示す。

(a) スチレン(St, CH₂=CHC₆H₅)をポリエチレン基材にグラフト重合し、濃硫酸を用いてベンゼン環をスルホン化する(Ishigaki et al., 1981)。この方法では、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体からカチオン交換樹脂を製造する場合と同じスルホン化反応をおこなう必要がある。

(b) エポキシ基をもつモノマーであるグリシジルメタクリレート(GMA, CH₂=CC₆H₄COOCH₂CHOCH₂)を前駆体としてグラフト重合する。そして、エポキシ基と亜硫酸ナトリウム(SS, Na₂SO₃)との反応によってスルホン酸基をグラフト鎖に導入できる。この方法はエポキシ基の高い反応性を利用しているため、穏和な反応条件でスルホン酸基を導入できる。

(c) スルホン酸基をもつビニルモノマーであるスチレンスルホン酸ナトリウム(SSS, CH₂=CHC₆H₄SO₃Na)をポリエチレン基材にグラフト重合する。この方法は一段階の反応でスルホン酸基を導入できるので、実用的に非常に有利である。

1-4 イオン交換体によるタンパク質の分離精製

1) バイオ生産物の分離精製

バイオ生産物の工業的生産は、急速に拡大しつつある。とくに医薬品、食品、化粧品分野でのファインケミカルズの生産は種類が多岐にわたるだけでなく、量的にも著しく増大しつつある。バイオ生産物の生産プロセスにおいて、目的物質の分離精製を中心としたダウンストリームプロセッシングは、製品の質を決めるだけでなく、製造コストにも大きく影響する。そのため、'分離精製度'が高く、かつ'分離精製速度'の速い分離操作が要求されている。

2) イオン交換クロマトグラフィー

タンパク質の分離精製において最も効率のよい分離手段はクロマトグラフィーである。よく用いられるクロマトグラフィーの分配機構および特徴をTable1-1に示す。近年、生体分子の特異的な親和力（アフィニティ）を利用したアフィニティクロマトグラフィー技術によりタンパク質の分離精製がさかんにおこなわれている（Sada, 1990）。これに対し、カチオンやアニオンを分離精製するために広く利用されているイオン交換作用も、タンパク質の選択的な分離に応用できる（Church & Whinna, 1986; Kato et al., 1987）。ほとんどのタンパク質は極性をもち、荷電し得るので、電荷の違いを利用したイオン交換によるタンパク質の分離が有効である。荷電基をもつ充填材が溶質分子上の反対符号の荷電基と静電的に相互作用し保持するのがイオン交換クロマトグラフィーである。概して分離能が高いため、タンパク質精製の早い段階に用いられることが多い。タンパク質の分離精製によく用いられるイオン交換体をTable1-2に示す。

イオン交換体はイオン交換基と基材で特徴づけられる。イオン交換基は、カチオン交換用として弱酸性のカルボキシメチル（CM）基と強酸性のスルホプロピル（SP）基が、アニオン交換用として弱塩基性のジエチルアミノエチル（DEAE）基と強塩基性の第四級アミノエチル（QAE）基が用いられている。

タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーに用いる基材は、大きい分子が入り込める網目構造をもち、非特異的な不可逆的吸着が少ない親水性の表面をもつ材料がよい。このような特性を保ちながらも物理的強度の高い充填材が開発されている（Tsuei & Yang, 1990; King & Pinto, 1992; Li and Spencer, 1992）。

3) メンブレンクロマトグラフィーとパーフュージョンクロマトグラフィー

従来のイオン交換およびアフィニティクロマトグラフィーを用いた分離システムでは、ビーズ状の吸着剤を使用するので、タンパク質のビーズ内部での移動は濃度勾配を駆動力とした拡散である。そのため、総括のタンパク質吸着速度は、ビーズ内部でのタンパク質の拡散速度に支配されるという欠点をもっている。また、操作圧力を上げるとビーズの圧密化が起きるという問題もある。

Brandt et al. (1988) は、タンパク質が通過できる細孔を有する膜の細孔表面にリガンドを固定し、そこへタンパク質を含む溶液を強制的に流通させるシステ

ム、すなわちメンブレンクロマトグラフィーを提案した。そしてProtein Aをリガンドとして免疫グロブリン (IgG) を、あるいはゼラチンをリガンドとしてフィブロネクチン (FN) をアフィニティ吸着する微多孔性膜材料を開発した。

われわれの研究グループは、放射線グラフト重合法によって、微多孔性膜の細孔表面にアフィニティリガンド (Iwata et al., 1991; Kim et al., 1991) をもつポリマー鎖を固定した。合成した膜の内面から外面へタンパク質溶液を透過させると、タンパク質は対流に乗ってアフィニティリガンド近傍まで輸送されるため、拡散移動抵抗が無視できる。クロマトグラムが流量に依存しないという吸着特性をもつので、タンパク質を高速かつ選択的に吸着することができる。実用化する場合、デッドスペースや逆混合をなくすように、膜モジュールを工夫して液の流れを制御する必要がある。

膜でなく、あくまでビーズにこだわっても対流に支援された分離を実現できる。最近、Afeyan et al. (1990) は、直径 $1 \mu\text{m}$ 程度の孔 (throughpore, 貫通孔とよぶ) が開いていて、そのまわりにイオン交換基やアフィニティリガンドを担持できる小さな孔をもったビーズを開発した。このビーズは高い操作圧力下でも圧密化が起きないという特徴をもつ。そして、このビーズを用いたクロマトグラフィー (パーフュージョンクロマトグラフィーとよぶ) によって、従来の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の10倍の流速でタンパク質を分離することに成功した。ここでも、ビーズ充填カラムのクロマトグラムが流量に依存しないという吸着特性が確認された。パーフュージョンクロマト用のビーズをつぶして、平たい膜にすれば、メンブレンクロマト用の材料に変身させることができる。メンブレンクロマトもパーフュージョンクロマトも "Convection-Aided Separation" である。

引用文献 (第1章)

- Afeyan, N. B.; Gordon, N. F.; Mazaroff, I.; Varady, L.; Fulton, S. P.
J. Chromatogr. 519, 1 (1990).
- Albright, R. L.; Yarnell, P. A. "Ion-Exchange Polymers." In Encyclopedia
of Polymer Science and Engineering; Mark, H. F.; Bikales, N. M.;
Overberger, C. G.; Menges, G., Eds.; Wiley: New York, Vol. 8 (1987).
- Brandt, S.; Goffe, R. A.; Kessler, S. B.; O'sConnor, J. L.; Zale, S. E.
Bio/Technology 6, 779 (1988).
- Church, F. C.; Whinna, H. C. Anal. Biochem. 157, 77 (1986).
- Ellinghorst, G.; Niemoller, A.; Vierkotten, D.
Radiat. Phys. Chem. 22, 635 (1983).
- Hayashi, K.; Fukumura, H.; Yamamoto, N.; Yamashita, I.
Kobunshi Ronbunshu 44, 681 (1987).
- Hoffman, A. S.; Cohn, D.; Hanson, S. R.; Harker, L. A.; Hoabett, T. A.;
Ratner, B. D.; Reynolds, L. O.
Radiat. Phys. Chem. 22, 267 (1983).
- Ishigaki, I.; Sugo, T.; Senoo, K.; Takayama, T.; Machi, S.; Okamoto, J.;
Okada, T.
Radiat. Phys. Chem. 18, 899 (1981).
- Iwata, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J.
Biotechnol. Prog. 7, 412 (1991).

- Kaetsu, I.; Kumakura, M.
Radiat. Phys. Chem. 30, 263 (1987).
- Kato, Y.; Kitamura, T.; Mitsui, A.; Hashimoto, T.
J. Chromatogr. 398, 327 (1987).
- Kim, M.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I.
J. Chromatogr. 586, 27 (1991).
- King, J. -K.; Pinto, N. G. J. Chromatogr. 609, 61 (1992).
- Li, Y.; Spencer, H. G. J. Biotechnology 26, 203 (1992).
- Okawara, T.; Saito, K. Kankyo Gijyutsu 22, 272 (1993).
- Okamoto, J.; Sugo, T.; Katakai, A; Omichi, H.
J. Appl. Polym. Sci. 30, 2967 (1985).
- Omichi, H.; Okamoto, J.
Radiat. Phys. Chem. 30, 151 (1987).
- Sada, E. J. Chem. Eng. Japan 23, 259 (1990).
- Saito, K.; Uezu, K.; Hori, T.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J.
AIChE J. 34, 411 (1988).
- Saito, K; Kaga, T.; Yamagishi, H.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J.
J. Membr. Sci. 43, 131 (1989a).

Saito, K.; Ito, M.; Yamagishi, H.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J.
Ind. Eng. Chem. Res. 28 1808 (1989b).

Tanso, S. Hosityasen To Sangyo 35, 19 (1986).

Tsuei, A. C. R.; Yang, V. C. Biomaterials 11, 734 (1990).

Dezu, K.; Saito, K.; Hori, T.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J.
Genshiryoku Gakkaishi, 30, 359 (1988).

Wheaton, R. M.; Lefevre, L. J. "Ion Exchange." In Encyclopedia of
Chemical Technology; Mark, H. F.; Othmer, D. F.; Overberger, C. G.;
Seaborg, G. T., Eds.; Wiley: New York, Vol. 13 (1981).

Yamagishi, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J.
Nippon Kagaku Kaishi 212 (1988).

Yamagishi, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J.
Chem. Mater. 2, 705 (1990).

Yamagishi, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I.
Chem. Mater. 3, 987 (1991).

Yamagishi, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Hosoi, F.; Okamoto, J.
J. Membr. Sci. 85, 71 (1993).

Table 1-1. バイオ生産物分離に用いられる液体クロマトグラフィー

液体クロマトグラフィー	分配の生じる機構	溶出法	特 徴	対象物質
ゲル透過クロマトグラフィー (GFC) (ゲルクロマトグラフィー) (サイズ排除クロマトグラフィー)	分子の大きさ・形状	isocratic elution	分配係数が0~1なので、分離にある程度のカラム長さが必要。 処理条件が穏和。 高回収率。	脱塩、緩衝液交換、タンパク質などの分子量分離
イオン交換クロマトグラフィー (IEC)	静電力	段階溶出 勾配溶出	広い対象に適用可能。 溶出条件によって分離度調節可能。処理量大。 目的画分濃縮。	低分子・高分子電解質など 広範囲
疎水性クロマトグラフィー (HIC)	疎水力	段階溶出 勾配溶出	吸着体の吸着力を広範囲に調節可能。 高イオン強度で吸着。 種々の溶出法によって分離可能。	タンパク質、 細胞、コンホメーション 変化を伴うタンパク質
クロマトフォーカシング	等電点差	勾配溶出	高い分離能(0.05 pI 差)。 目的画分濃縮度高い。	アイソザイムなど分離困難なタンパク質
アフィニティクロマトグラフィー	生物学的親和力	段階溶出 (勾配溶出)	高い選択性。 目的画分濃縮度高い。 処理量大。 リガンド、分離条件の検討重要。	低濃度生理活性物質

Table 1-2. よく用いられるイオン交換体

荷電基	基 材	商品名 ¹² (会社) ¹³
陰イオン交換体 ジエチルアミノエチル (DEAE) $-(CH_2)_2N^+H(C_2H_5)_2$ $pK_a^{11} 9\sim 10$	セルロース デキストラン アガロース	DEAE-Sephacel (Pharmacia) DE 52 など (Whatman) Cellex D (Bio-Rad) DEAE-Cellulofine (生化学工業) DEAE-Sephadex (Pharmacia) DEAE-Sepharose (Pharmacia) DEAE-Bio-GelA (Bio-Rad)
第四級アミノエチル (QAE) $-(CH_2)_2N^+R(C_2H_5)_2$ $pK_a > 13$	合成ポリマー デキストラン	DEAE-Toyopearl (東ソー) QAE-Sephadex (Pharmacia)
陽イオン交換体 カルボキシメチル (CM) $-CH_2COO^-$ $pK_a 3\sim 5$	セルロース デキストラン アガロース	CM 52 など (Whatman) Cellex CM (Bio-Rad) CM-Cellulofine (生化学工業) CM-Sephadex (Pharmacia) CM-Sepharose (Pharmacia) CM-Bio-GelA (Bio-Rad)
ホスホ $-O-PO_3^{2-}$ $pK_{a1} 1\sim 2$ $pK_{a2} 6\sim 7$	合成ポリマー セルロース	CM-Toyopearl (東ソー) P 11 (Whatman) Cellex P (Bio-Rad)
スルホプロピル (SP) $-(CH_2)_3SO_3^-$ $pK_a < 1$	デキストラン 合成ポリマー	SP-Sephadex (Pharmacia) SP-Toyopearl (東ソー)

†1 ここに示す pK_a 値はいずれもおよその目安。荷電基のミクロ環境の違いによる広がりがあるほか、イオン強度などによりかなり変動する。

†2 商品の多くはさらに網目の大きさや粒径などの特性を示す記号や数字で区別されている。

†3 略称で示した。正式名称はつぎの通り。

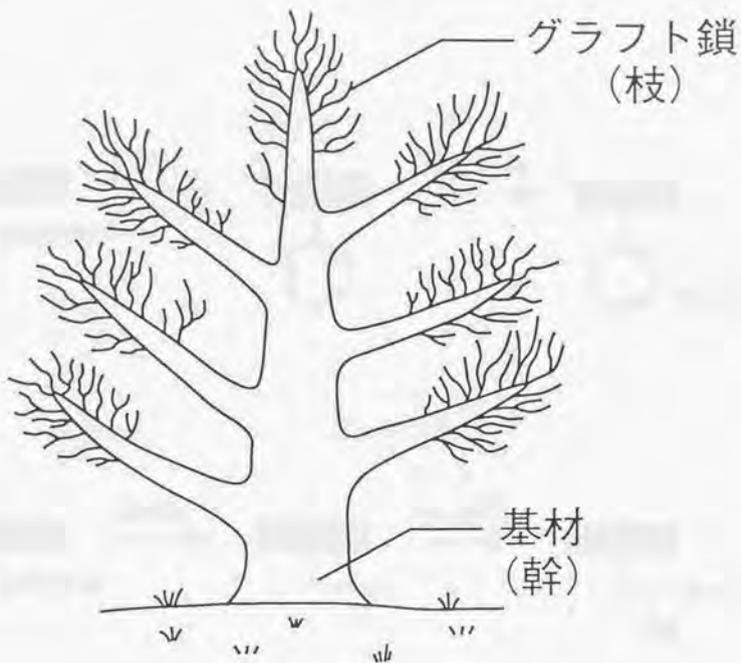
Pharmacia: Pharmacia LKB Biotechnology AB (Uppsala, スウェーデン); 国内販売元、ファルマシア (株)。

Whatman: Whatman Ltd. (Maidstone, Kent, 英国); 国内販売元、ワットマン (株)。

Bio-Rad: Bio-Rad Laboratories Chemical Division (Richmond, California, 米国);

国内販売元、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)。東ソー: 東ソー (株)。

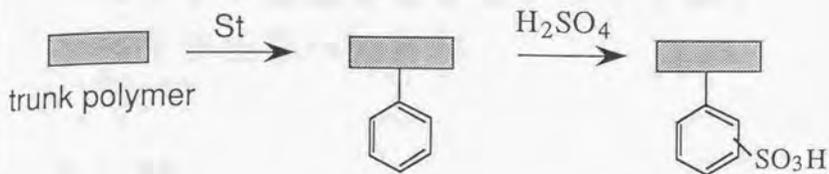
生化学工業: 生化学工業 (株); Cellulofine の製造元はチッソ (株)。



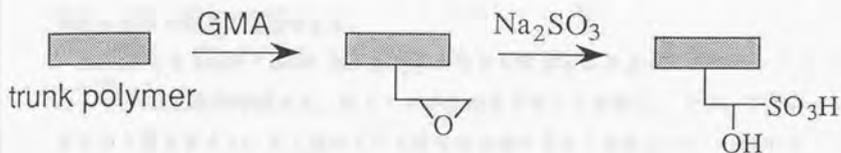
基材	<ul style="list-style-type: none"> ● 物理的強度 ● 化学的耐久性
グラフト鎖	<ul style="list-style-type: none"> ● 分離機能 ● 触媒機能 ● 表面改質

Fig. 1-1. 放射線グラフト重合法の模式図

(a)



(b)



(c)



Fig. 1-2. 放射線グラフト重合法によるスルホン酸基の導入法

第2章

スルホン酸基を有するグラフト鎖の 高分子基材への付与

2-1 緒言

スルホン酸基を有するビニルモノマーであるスチレンスルホン酸ナトリウム (SSS, $\text{CH}_2=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$) を放射線グラフト重合法により高分子基材にグラフト重合すれば、用途に適した形状や材質をもつ強酸性カチオン交換材料を従来より穏和な条件で簡単に合成できる。

Shkolnik & Behar (1982) は、放射線グラフト重合法によるポリエチレンフィルムへのSSSの重合を試みた。まずアクリル酸をグラフト重合し、つづいてSSSをグラフト重合するという二段グラフト重合法を適用することによって、SSSのグラフト重合速度を増大させた。SSSのグラフト重合速度を上げるためには基材の親水化が必要であると報告している。しかしながら、親水性あるいは疎水性という点で性質の異なる種々のモノマーを一段目に用いて、二段目のSSSグラフト重合速度を制御するという系統的な検討がされていない。また、二段グラフト重合法を用いることは、照射と重合反応をそれぞれ2回繰り返すことになり、基材の物理的強度の低下やグラフト鎖の脱離といった問題が生じるだけでなく、製造コストの点からも不利である。

本章では、SSSと親水性モノマーの混合モノマー液中でグラフト重合反応をおこなう共グラフト重合法を提案し、1回の照射と反応によってさまざまな材質および形状をもつ高分子基材に強酸性カチオン交換基であるスルホン酸基を導入できることを示す。この手法により、高分子基材の親水化とスルホン酸基の導入を同時に一段階でおこなうことができ、イオン交換体の合成プロセスを従来のそれらに比べて簡素化できる。単独グラフト重合法、二段グラフト重合法、および共グラフト重合法について比較し、Fig. 2-1にまとめた。

2-2 実験

1) 基材と試薬

高分子基材として、多孔性ポリエチレン (PE) 中空糸膜 (旭化成工業 (株) 製)、および多孔性酢酸セルロース (CTA) 平膜 (富士写真フィルム (株) 製) を用いた。各基材の物性を Table 2-1 にまとめた。モノマーとして、市販特級のアクリル酸 (AAc, $\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$)、アクリロニトリル (AN, $\text{CH}_2=\text{CHCN}$)、グリシジルメタクリレート (GMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CHOCH}_2$)、2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)、メタクリル酸メチル (MMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$)、酢酸ビニル (VAc, $\text{CH}_2=\text{CHOCOCCH}_3$) およびスチレンスルホン酸ナトリウム (SSS, $\text{CH}_2=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$) をそのまま使用した。精製水および 1 級のメタノールを溶媒として用いた。

2) 放射線グラフト重合

放射線グラフト重合反応は、以下の手順によりおこなった。カスケード型電子加速器 (加速電圧 1.5 MeV、電子線電流 1 mA) を用いて、基材に常温、窒素雰囲気下で所定量の電子線を照射した。その後、モノマー溶液と照射基材を気相あるいは液相中で接触させ、グラフト重合反応をおこなった。このときのグラフト重合反応条件を Table 2-2 にまとめた。照射した基材はガラスアンプルに投入する前に、実験の操作の都合から、約 3 分間空気に接触させた。

液相グラフト重合法では、あらかじめ窒素バブリングにより脱酸素しておいたモノマーを満たしたガラスアンプル中に照射基材を投入し、所定温度で所定時間反応をおこなった (Yamagishi et al., 1991)。また、水を溶媒とするモノマー液中で多孔性 PE 製中空糸膜へグラフト重合する場合には、細孔内にモノマーが侵入し、グラフト重合反応が開始するように、照射した基材をメタノールに 5 分間浸し、ただちに水で置換した後、グラフト重合反応をおこなった。

気相グラフト重合法では、ガラスアンプル中であらかじめ凍結と溶解を 3 回繰り返すことによって脱気したモノマーを減圧状態にして蒸発させ、その蒸気と照

射基材を接触させて反応をおこなった。このとき、アンプル中のモノマーがすべて消費された時点で反応を終了させた (Saito et al., 1989)。

反応終了後、膜を80°Cの洗浄液中で3回洗浄することによって、残ったモノマーやホモポリマーを除去した。洗浄後、膜を真空乾燥し、反応後の膜重量を測定した。

3) 単独グラフト重合

SSSを水に溶かし、濃度を1Mに調整したモノマー液中でPE膜およびCTA膜のグラフト重合反応をおこなった。グラフト重合により基材に導入されたSSS量は、以下のような方法で中性塩分解容量を測定することによって求めた。まず、グラフト重合膜を1Mの塩酸に浸し、グラフト鎖中のスルホン酸基をNa型からH型に変換した。つぎに、膜を十分に水洗し、5wt%のNaCl水溶液に2時間浸した。グラフト鎖中のスルホン酸基によってNaClが分解され、Na⁺が吸着される。このとき遊離してきたHClを1/50MのNaOH水溶液で滴定し、スルホン酸基量を求めた。さらに、その値を基材の重量で割ることにより、スルホン酸基密度 [mol/kg-TP] を求めた。ここで、TPはTrunk Polymer (基材) の略である。

4) 二段グラフト重合

まず、AAc、AN、GMA、HEMA、MMAおよびVAcをPE製中空糸膜にグラフト重合した。一段目グラフト重合後、GMA重合膜については、80°Cの0.5M硫酸中でエポキシ基を開環させてジオール基に変換し、またVAc重合膜については、80°Cの1M水酸化カリウム水溶液中でケン化反応によってアルコール性水酸基に変換した。一段目グラフト重合後、あるいは官能基変換後、膜を洗浄した。乾燥後、重量を測定した。

一段目のグラフト重合によって基材に導入された各モノマーの基材重量当たりのグラフト重合量は、以下の式で定義する。

$$q = [(W_1 - W_0) / M_n] / W_0 \quad [mol/kg-TP] \quad (2-1)$$

ここで、W₀は基材の重量、W₁は一段目グラフト重合後の重量である。また、M_nはGMAとVAc以外のモノマーの分子量である。ジオール基導入後のGMAのM_nは142+18、ケン化反応後のVAcのM_nは86+18-60である。ここで、142、86、60および18という値はそれぞれGMA、VAc、酢酸および水の分子量である。

つづいて、二段目の照射後、SSSのグラフト重合反応をおこなった。SSSのグラフト重合量は、中性塩分解容量を測定することによって求めた。

5) 共グラフト重合

AAcとSSS、あるいはHEMAとSSSを混合したモノマー液中に照射基材を投入し、共グラフト重合反応をおこなった。SSSのモノマー濃度を1Mに固定し、AAcのSSSに対する濃度を0.1~10、またHEMAのSSSに対する濃度を0.1~5まで変化させた。反応前に仕込むSSSのモル数が、基材に導入されたSSSのモル数の100倍以上という十分過剰な量になるようにした。

共グラフト重合によって基材に導入された全グラフト重合量は膜の重量変化より、SSSの導入量は中性塩分解容量を測定することによってそれぞれ求めた。またAAcおよびHEMAの導入量は、全グラフト重合量からSSS導入量を差引くことにより算出した。

6) ESR測定

単独グラフト重合において、各基材の重合開始ラジカル種を同定するため、電子スピン共鳴 (ESR) 測定装置 (JEOL製 JES-FE3X型) を用いて、電子線照射後に生成したラジカルのESRスペクトルを測定した。200kGyの電子線を照射し、3分間空気に曝した基材を試料管に入れ、シリコン栓で封をした。グラフト重合反応前に操作上やむを得ず基材を空気と3分間ほど接触させることを考慮に入れ、グラフト重合に寄与する初期ラジカル濃度を正確に測定するために、ESR測定前にも照射基材を3分間空気と接触させた。この試料管をTE₀₁₁円筒形キャビティに挿入し、Xバンド (9GHz帯) のマイクロ波を用いて、出力10⁻³mW、100kHz磁場変調の条件で測定した。測定は、空气中、液体窒素温度 (77K) でおこなった。

二段グラフト重合に寄与したラジカルを同定するために (Omichi & Araki, 1977; Ogiwara et al., 1985)、AAcを一段目にグラフト重合したPE膜のESRスペクトルを測定した。二段目のSSSグラフト重合反応初期のラジカル濃度をほぼ正確に測定するに、ESR測定前に以下のような前処理をおこなった。(1)AAcグラフト重合膜に100kGyの電子線を照射する。(2)膜をメタノールに5分間浸漬し、ただちに水で置換する。(3)膜を6時間真空乾燥する。ここで(1)と(2)の操作は、グラフト

重合のときと同様な前処理操作である。また、(3)の操作をおこなった理由は、サンプル中に水分が含まれているとESRスペクトルのノイズの原因となるからである。得られたESRスペクトルには二種類のラジカルが含まれている。幹ポリマー (PE) 上に生成したラジカル、および枝ポリマー鎖 (AAcグラフト鎖) 上に生成したラジカルである。これらのラジカルの分離法の説明をAppendixに示した。

7) 膨潤度の測定

AAcおよびANを一段目にグラフト重合したPE膜を純水に浸したときの膜の膨潤度を測定した。乾燥したAAcおよびANグラフト重合膜をメタノール中に5分間浸し、ただちに水で置換した。乾燥状態と湿潤状態での膜の内径と外径を顕微鏡で、長さを定規で測定し、両状態での膜体積を算出した。膨潤度は以下の式で定義した。

$$\text{膨潤度} = V_w/V_d \quad (2-2)$$

ここで、 V_w および V_d はそれぞれ乾燥状態および湿潤状態での膜体積である。

2-3 結果と考察

1) 単独グラフト重合

多孔性ポリエチレン (PE) 膜および多孔性酢酸セルロース (CTA) 膜へスチレンスルホン酸ナトリウム (SSS) の単独グラフト重合反応をおこなったときに導入されたSSS密度 (基材1kgあたりのSSSモル数) の経時変化をFig. 2-2に示した。5時間後のSSS密度を比較すると、CTA膜の場合は5mol/kgを越えているのに対して、PE膜の場合は1mol/kgであった。これは、親水性の高いCTA膜へのSSSのグラフト重合速度が大きいことを示している。Mey-Marom & Shkolnik (1990) は、エチレンビニルアルコール共重合体 (EVAL) を基材として用いた場合、ポリエチレンよりも基材の親水性が高いので、スチレンスルホン酸カリウムが容易にグラフト重合できると報告している。

放射線前照射グラフト重合反応においては、照射によって高分子基材に生成するラジカルがグラフト重合反応の開始点となる。ESR測定によって求められた初期ラジカル濃度は、PE膜が 1.1×10^{19} spin/g、CTA膜が 2.6×10^{17} spin/gであった。C

TAは結晶化度が5%程度と低く、また結晶サイズが小さいために、電子線照射によって生成したほとんどのラジカルは結晶表面で空気と接触し、パーオキシラジカルとなり消滅する。これに対し、本研究で使用したPE基材は高密度ポリエチレンであり、CTAに比べて高い結晶化度(55%)をもつ。PEの結晶中には酸素が拡散できないため、アルキルおよびアリルラジカルが結晶中に保存される(Uezu et al., 1992)。反応初期のグラフト重合速度とラジカル濃度との関係をPEとCTAで比較した場合、ラジカル濃度はPEがCTAの40倍もあるにもかかわらず、SSSのグラフト重合速度はPEがCTAの1/5である。一般に、グラフト重合速度は、(1)高分子基材中のラジカル濃度、および(2)ラジカルへのモノマーの拡散速度に支配される。PEとCTAでSSSグラフト重合速度が大きく異なった理由は、SSSグラフト重合速度が(1)の因子よりもむしろ(2)の因子によって支配されるからである。

2) 二段グラフト重合

多孔性ポリエチレン(PE)膜に、種々のモノマーをグラフト重合して膜の物性を変え、続いてSSSをグラフト重合するという二段グラフト重合法によってSSSを導入する方法について検討した。Shkolnik & Behar(1982)は、PEにSSSをグラフト重合するためにはAAcをあらかじめグラフト重合する必要があると報告している。しかしながら、その理由の考察をしていないし、他のモノマーの使用についての検討もおこなっていない。また、彼らの実験によるSSS導入量は1mol/kg-TP以下で、実用的に十分なスルホン酸基量とはいえない。

一段目のモノマーのグラフト重合量を変化させて、二段目に導入されたSSS密度を調べ、Fig.2-3に示す。メタクリル酸メチル(MMA)やアクリロニトリル(AN)のような疎水性モノマーを一段目にグラフト重合させた場合、二段目に導入されたSSS密度は全く向上せず、逆にPE基材よりも低い値を示した。

一方、親水基であるカルボキシル基(-COOH)を有するアクリル酸(AAc)、およびアルコール性水酸基(-OH)を有するヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)を一段目にグラフト重合させた場合、一段目グラフト重合量の増加に伴って二段目のSSS密度も増大した。また、グリシジルメタクリレート(GMA)をグラフト重合し、エポキシ基を二つの隣接する水酸基(ジオール基)に変換した場合、および酢酸ビニル(VAc)をグラフト重合し、加水分解によってアルコール性水酸基

に変換した場合もまた、一段目グラフト重合量の増加に伴って二段目のSSS密度も増大した。一段目のAAcグラフト重合量が12mol/kg-TPの場合、二段目に導入されたSSS密度は反応時間3時間で約6mol/kg-TPに達する。これはSSS単独グラフト重合のときの約6倍の導入量である。

二段グラフト重合によってSSSのグラフト重合速度が促進された理由として、(1) SSSのグラフト重合に寄与するラジカル濃度が増加したこと、および(2) 基材の構造が変化し、SSSモノマーがPEの結晶表面に拡散しやすくなったことがあげられる。

まず、(1)の要因についての可能性を調べるために、二段目のSSSグラフト重合に寄与するラジカルの種類および濃度を測定した。一段目にアクリル酸(AAc)をグラフト重合したPE膜にさらに100kGyの電子線を照射した後、ESRを用いて、生成した初期ラジカルのスペクトルを測定した。得られた積分型ESRスペクトルをPE基材上に生成したラジカルのスペクトルとAAcグラフト鎖上に生成したラジカルのスペクトルとに分離し、それぞれのラジカル濃度を求め、Fig. 2-4に示した。AAcグラフト鎖上のラジカルは、照射後、空気に曝すことによって消滅する割合が高いので、AAcグラフト鎖上に残存するラジカル量はAAcグラフト重合量によらずほとんど一定である。これに対し、AAcグラフト重合量が高い膜ほどPE基材上に生成するラジカル量は少なくなっている。これは、AAcグラフト鎖がポリエチレンの結晶領域の構造をゆるめ、結晶部に捕捉されたラジカルの再結合を促進するからである。

つぎに、(2)の要因についての可能性を検討するために、一段目グラフト重合後の膜の水中での膨潤度を測定し、膜の親水性の度合を調べた。Fig. 2-5にAAcおよびAN重合膜の水中膨潤度、すなわち湿潤重量と乾燥重量との比を示す。AAc重合膜の膨潤度はAAcグラフト重合量の増加に伴って増加した。一方、AN重合膜の場合、ANのグラフト重合量にかかわらず、ほとんど膨潤しなかった。

これより、一段目に親水性モノマーをグラフト重合した場合、カルボキシル基やアルコール性水酸基が膜に導入されたため、膜の親水性が増し、水の侵入によって膜のマトリクスが押し広げられる。そのため、二段目グラフト重合反応時にSSSモノマーがPEのマトリクス内に侵入しやすくなり、SSSのグラフト重合速度も大きくなる。一方、疎水性モノマーを一段目にグラフト重合した場合、膜は全く

膨潤しないのでSSSのPEマトリクス内への侵入が阻害される。二段グラフト重合によってSSSの重合が促進されるメカニズムをFig. 2-6に示す。

3) 共グラフト重合

二段グラフト重合は、照射と重合反応をそれぞれ2回ずつ繰り返すことになり、基材の物理的強度の低下やグラフト鎖の脱離といった問題が生じるだけでなく、製造コストの点からも不利である。そこで、SSSと親水性モノマーであるAAcやHEMAとの共グラフト重合法を提案した。

共グラフト重合法は、二種類のモノマーを同時に基材と接触させ、グラフト重合反応をおこなう手法である。これによって、基材に二つの機能を同時に付与できる。Uenoyama & Hoffman (1988)は、イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm) とアクリルアミド (AAm) の重合比で共重合体の体積相転移点が決まることを利用して、生体環境温度 (37°C) に体積相転移点をもつ高分子材料を合成し、タンパク質吸着や細胞付着のモデル材料を得た。また、Sreenivasan & Rao (1992)は、親水性モノマーであるヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) と疎水性モノマーであるアクリル酸ブチル (BA) を重合比を変えてポリウレタンにグラフト重合し、抗血栓性材料として最適な性質を表面にもたせることを検討している。さらに、Chenら(1992)は、ビニレンカーボネート (VCA) を酵素や抗原を固定化するためのリガンドとして、また、ビニルメチルアセトアミド (VIMA) を基材を親水化するためのモノマーとして、それぞれグラフト重合し、二種類のモノマーに機能を分担させている。

PE膜に、AAc/SSSおよびHEMA/SSSの共グラフト重合反応をおこなったときグラフト重合量の経時変化をFig. 2-7に示した。AAcとHEMAをそれぞれ1Mずつ混合したモノマー液中で共グラフト重合反応をおこなった場合、12時間後のSSSグラフト重合量は、9mol/kg-TPで、これはSSS単独グラフト重合のときの約9倍の重合量である。また、最大で2.5mol/kg-productの中性塩分解量を有するイオン交換体を合成できた。これは、市販のマクロポラス型強酸性カチオン交換樹脂 (Amberlite 200) の約半分のイオン交換容量に相当する。これらの結果より、SSSと親水性モノマーであるAAcおよびHEMAとの共グラフト重合反応により、疎水性高分子基材の親水化とスルホン酸基の導入を同時に一段階でおこなうことができることが示された。

つぎに、共グラフト重合反応速度のモノマー組成比依存性について調べた。モノマー液中のSSS濃度を一定(1M)にして、親水性モノマーであるAAcおよびHEMAの濃度を変化させ、共グラフト重合反応をおこなった。反応時間5hで膜に導入された両モノマーのグラフト重合量と混合モノマー液中での両モノマーの組成比との関係をFig. 2-8に示す。AAcとSSSの共グラフト重合の場合、モノマーをAAc/SSS=1/3の割合で混合したときに、膜に導入されるSSSのグラフト重合量が最も高く、その値は7.1mol/kg-TPであった。一方、HEMAとSSSの共グラフト重合の場合、SSSグラフト重合量は、両モノマーの組成比にはほとんど依存せず、一定の値(7.4mol/kg-TP)を示した。この値は、AAc/SSS共グラフト重合系でのSSSグラフト重合量の最大値とほぼ等しい。HEMA/SSSの共グラフト重合系では、HEMA/SSS=1/10でも十分なSSSグラフト重合量を得られることがわかった。

つぎに、親水性モノマーのグラフト重合量に着目すると、AAcのグラフト重合量は、AAcモノマー濃度には必ずしも比例せず、SSSと等モル量以上のAAcを入れた場合、逆にグラフト重合量は減少することがわかった。一方、HEMAのグラフト重合量は、HEMAモノマー濃度の増加と共に単調に増加した。AAcはカルボキシル基をもつモノマーであり、その解離状態が重合のしやすさに大きく影響する。AAc/SSS混合モノマーのpHは、モノマー組成比によって大きく変化するので、これがAAcのグラフト重合量の変化に寄与したと考えられる(Grabiel & Decker, 1962)。AAcグラフト重合量の最も大きかった混合モノマーは、AAc/SSS=1/1の場合で、このときpH=2.9である。これに対し、HEMAは中性モノマーであるために重合速度はpHに依存しない。これが、モノマー組成比とグラフト重合量との関係がAAcとHEMA両モノマー間で異なった理由である。

4) いろいろな形状の基材への適用

材質および形状の異なる4種類の高分子基材、すなわちポリエチレン(PE)製多孔性中空糸膜、ポリプロピレン(PP)製チューブ、PEおよびPPからなる不織布、およびポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製フィルムについてスルホン酸基の導入をおこなった。各基材の外観およびサイズをFig. 2-9に示した。

各基材へスチレンスルホン酸ナトリウム(SSS)とアクリル酸(AAc)の共グラフト重合をおこなったときのSSSグラフト重合量の経時変化をFig. 2-10に示した。

反応時間20時間での基材1kgあたりのSSSグラフト重合量は、中空糸膜が13.5mol、チューブが3.4mol、不織布が4.7mol、フィルムが1.9molであった。こうして得られたイオン交換体の応用として、中空糸膜は濾過を伴うイオンやタンパク質の分離精製、チューブはイオン交換カラム用の充填材、不織布はダストとガスを同時に吸着除去するフィルター、そしてフィルムは有機溶媒用イオン交換膜がある。

2-4 結言

放射線グラフト重合法により、スチレンスルホン酸ナトリウム (SSS) を既存の汎用性高分子にグラフト重合し、スチレン (St) - ジビニルベンゼン (DVB) 共重合体を母体とする従来のカチオン交換樹脂に代わる新しいイオン交換体を簡単に合成する方法について検討し、以下の知見を得た。

(1) 親水性のポリマー、たとえばセルローストリアセテート (CTA) 膜には、SSS は容易にグラフト重合した。

(2) 疎水性のポリマー、たとえばポリエチレン (PE) 膜の場合、まず親水性のモノマーを一段目にグラフト重合して膜を親水化した後、SSSをグラフト重合する手法、すなわち二段グラフト重合法によってSSSを導入できた。これは、膜の親水性があがったため、膜のマトリクスを押し広げるように水が侵入し、SSSモノマーがPE結晶表面へ拡散しやすくなったからである。

(3) アクリル酸 (AAc) やヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) のような親水性モノマーとSSSとを混合したモノマー中で共グラフト重合反応をおこなうことによって、ポリエチレン (PE)、ポリプロピレン (PP) およびテトラフルオロエチレン (PTFE) などの汎用性高分子にSSSを容易に導入することができた。PE製中空糸膜を基材にした場合、導入されたスルホン酸基量は2.5mol/kg-productで、実用的に十分な交換容量を有するイオン交換体を合成できた。

本章では、放射線共グラフト重合法を用いてカチオン交換基であるスルホン酸基を導入する方法について検討してきた。同様の手法で、第四級アンモニウム塩基を有するビニルモノマーであるビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロライド (VBTAC, $\text{CH}_2=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$) を基材に簡単に重合させることができる (Lee et al., 1993; Nho et al., 1994)。

スルホン酸基をもつ従来のカチオン交換樹脂の骨格はスチレン-ジビニルベンゼン (DVB) 共重合体であるので、酸触媒として用いると、分子サイズの大きな反応物質に対しては、DVB架橋による立体障害でその活性が均一系 (硫酸や塩酸) に比べて低い。これに対し、本研究で合成したスルホン酸基をもつグラフト高分子鎖は架橋されていないので酸触媒としての活性が高い (Mizota et al., 1994)。

ラジカル濃度の分離

ポリエチレン (PE) 膜、ポリアクリル酸 (polyAAc)、およびアクリル酸重合膜 (PE-AAc膜) に100kGyの電子線を照射し、メタノール処理、水置換操作をおこなった後、6時間真空乾燥させた。つぎに、これらの高分子中に生成したラジカルのESRスペクトルを測定した。それぞれの積分型ESRスペクトルをFig. 2-11に示した。PE-AAc膜のスペクトルはPEおよびpolyAAcのスペクトルが重なったものである (Clay & Charlesby, 1975)。PE-AAc膜のスペクトルのうち S_x 部はPE由来のアルキルラジカルのピークであり、polyAAc由来のピークとは重なっていない。

PEに電子線を照射した場合に生成するラジカルは、アルキルラジカルとアリルラジカルである。また、アルキルラジカルスペクトルの強度は S_x の32倍であることが報告されている (Uezu et al., 1992)。アリルラジカル濃度は、スペクトル全体の面積から、アルキルラジカル濃度を差し引いた濃度とした。このとき、アリルラジカルの濃度は S_x の9.5倍であることがわかった。したがって、PE-AAc膜のESRスペクトルのうち、PE由来のピークは、 S_x の41.5倍である。また、AAcグラフト鎖由来のピークは、全体のピーク面積から、PE由来のピーク面積を差し引いた値である。

引用文献 (第 2 章)

- Chen, G.; Dose, L.; Bantjes, A. "Investigations on Vinylene Carbonate. IV. Radiation-Induced Graft Copolymerization of Vinylene Carbonate and N-Vinyl-N-Methylacetamide onto Polyethylene Films." *J. Appl. Polym. Sci.* 45, 853 (1992).
- Clay, W. R.; Charlesby, A. "ESR Spectra of Irradiated Polyacrylic Acid." *Eur. Polym. J.* 11, 187 (1975).
- Gabieli, C. E.; Decker D. L. "Copolymerization Characteristics of Sodium Styrenesulfonate." *J. Polym. Sci.* 59, 425 (1962).
- Lee, W.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Wakuuchi, K. "Design of Urea Permeable Anion-Exchange Membrane by Radiation-Induced Graft Polymerization" *J. Membr. Sci.* 81, 295 (1993).
- Wey-Marom, A.; Shkolnik, S. "Irradiation Grafted Ion-Exchange Membranes from Uniaxially and Biaxially Oriented Copolymer." *J. Membr. Sci.* 49, 321 (1990).
- Wizota, T.; Tsuneda, S.; Saito, K.; Sugo, T. "Hydrolysis of Methyl Acetate and Sucrose in SO₃H-Group-Containing Grafted Polymer Chains Prepared by RIGP." submitted to *Ind. Eng. Chem. Res.*
- Nho, Y. C.; Sugo, T.; Tsuneda, S.; Wakuuchi, K. "Radiation-Induced Graft Polymerization of Vinyl Benzyl Trimethyl Ammonium Chloride onto Polyethylene Film" *J. Appl. Polym. Sci.* in press.

Ogiwara, Y.; Takumi, M.; Kubota, H. "Photoinduced Grafting of Acrylamide onto Polyethylene Film by Means of Two-Step Method."

J. Appl. Polym. Sci. 27, 3743 (1982).

Omichi, H.; Araki, K. "ESR Studies of the Radiation-Induced Multiple Graft Polymerization." J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 15, 1833 (1977).

Saito, K.; Ito, M.; Yamagishi, H.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Novel Hollow-Fiber Membrane for the Removal of Metal Ion during Permeation: Preparation by Radiation-Induced Cograftering of a Cross-Linking Agent with Reactive Monomer." Ind. Eng. Chem. Res. 28, 1808 (1989).

Shkolnik, S.; Behar, D. "Radiation-Induced Grafting of Sulfonates on Polyethylene." J. Appl. Polym. Sci. 27, 2189 (1982).

Sreenivasan, K.; Rao, K. V. C. "Studies on the Radiation-Induced Graft Copolymerization of Mixtures of N-Butyl Acrylate and 2-Hydroxyethyl Methacrylate on Polyurethane. I. Synthesis and Characterization." J. Appl. Polym. Sci. 44, 1703 (1992).

Uenoyama, S.; Hoffman, A. S. "Synthesis and Characterization of Acrylamide-N-Isopropyl Acrylamide Copolymer Grafts on Silicone Rubber Substrates." Radiat. Phys. Chem. 32, 605 (1988).

Uezu, K.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I. "Radicals Contributing to Preirradiation Graft Polymerization onto Porous Polyethylene." Radiat. Phys. Chem. 40, 31 (1992).

Yamagishi, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I.

"Introduction of a High-Density Chelating Group into a Porous Membrane without Lowering the Flux." *Ind. Eng. Chem. Res.* 30, 2234 (1991).

Table 2-1. Physical Properties of Trunk Polymers

	CTA	PE
shape	flat sheet	hollow fiber
size	diameter 47 mm thickness 0.135 mm	i.d. 1.95 mm o.d. 3.01 mm
average pore diameter	0.22 μm	0.34 μm
porosity	75 %	71 %
degree of crystallinity ^a	5 %	55 %

^a determined by differential scanning calorimetry (DSC).

Table 2-2. Reaction Conditions and Washings of Radiation-Induced Grafting of SSS onto PE and CTA

		dose, kGy	phase ^a	monomer conc.	solvent	temp, K	wash
one-step grafting / one monomer							
SSS		200	L	1 M	water	323	water
two-step grafting / two monomers							
AAc-SSS	1st	100	L	4 wt%	water	323	water
	2nd	100	L	1 M	water	323	water
AN-SSS	1st	100	V	100 %	-	313	-
	2nd	100	L	1 M	water	323	water
GMA-SSS	1st	100	L	10 vol%	methanol	313	DMF
	2nd	100	L	1 M	water	323	water
HEMA-SSS	1st	100	L	2 wt%	water	323	water
	2nd	100	L	1 M	water	323	water
MMA-SSS	1st	100	V	100 %	-	313	-
	2nd	100	L	1 M	water	323	water
VAc-SSS	1st	200	V	100 %	-	313	-
	2nd	100	L	1 M	water	323	water
AAc-SSS ^b	1st	50	L	20 wt%	water	343	water
	2nd	100	L	10 wt%	water	343	water
one-step grafting / two monomers (co-grafting)							
AAc/SSS		200	L	SSS 1 M AAc 0.1 10 M	water	323	water
HEMA/SSS		200	L	SSS 1 M HEMA 0.1 5 M	water	323	water

^a L: liquid phase; V: vapor phase. ^b Shkolnik and Behar (1982).
 Abbreviation of monomers: AAc = acrylic acid, AN = acrylonitrile,
 GMA = glycidyl methacrylate, HEMA = hydroxyethyl methacrylate,
 MMA = methyl methacrylate, VAc = vinyl acetate, SSS = sodium styrene
 sulfonate.

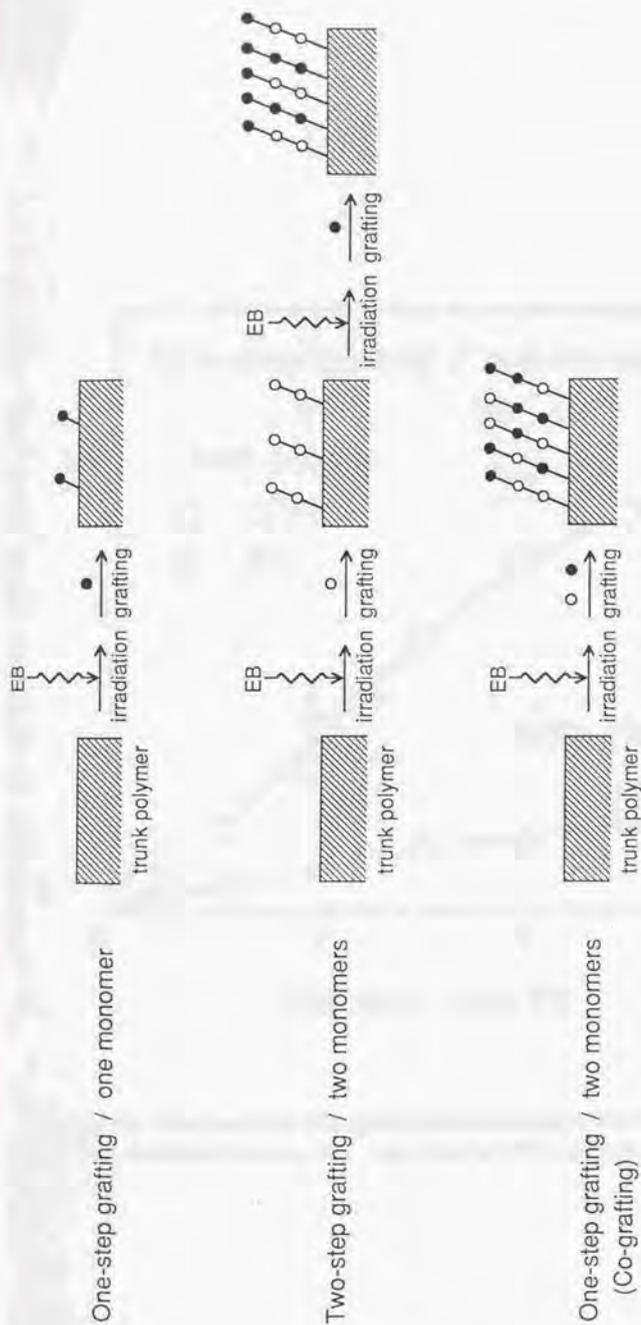


Fig. 2-1. Schematic illustrations of three grafting modes.
 (○) hydrophilic monomer; (●) sulfonic-acid-group-containing monomer; EB, electron beam.

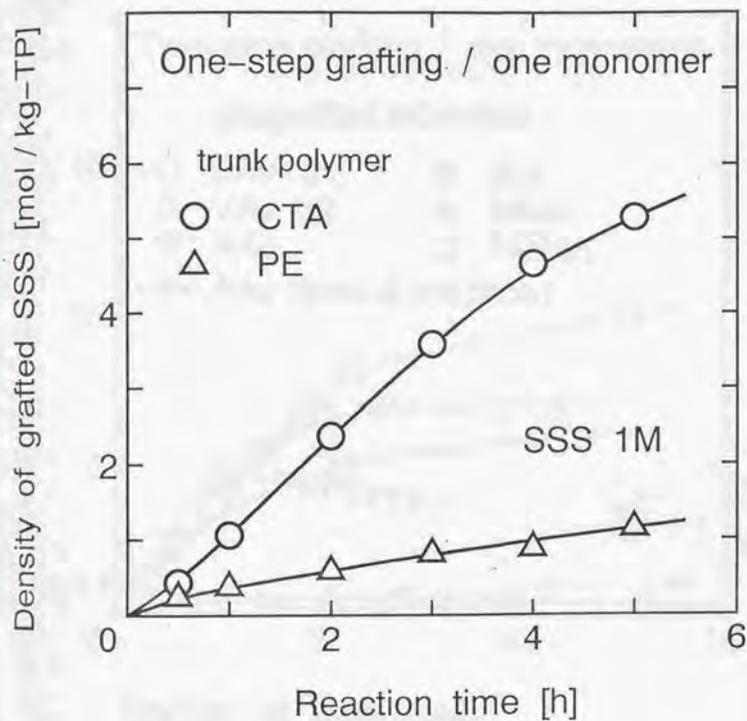


Fig. 2-2. Time course of SSS grafting onto PE and CTA membranes.
CTA = cellulose triacetate; PE = polyethylene; SSS = sodium styrene sulfonate

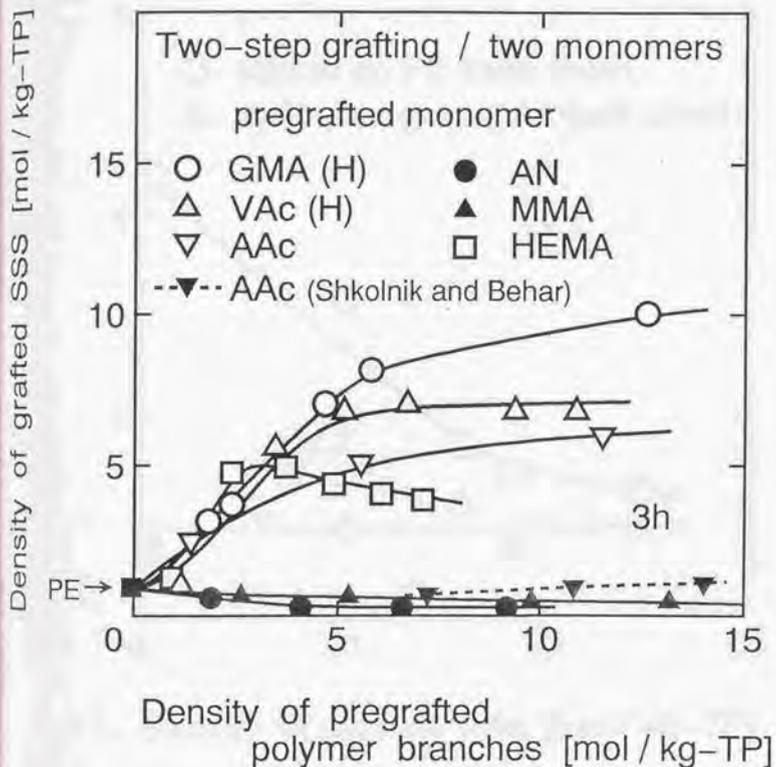


Fig. 2-3. The density of SSS grafted onto the PE modified with various densities of pregrafted polymer branches.
 AAc = acrylic acid; AN = acrylonitrile; GMA(H) = hydrolyzed glycidyl methacrylate
 HEMA = hydroxyethyl methacrylate; MMA = methyl methacrylate;
 VAc(H) = hydrolyzed vinyl acetate

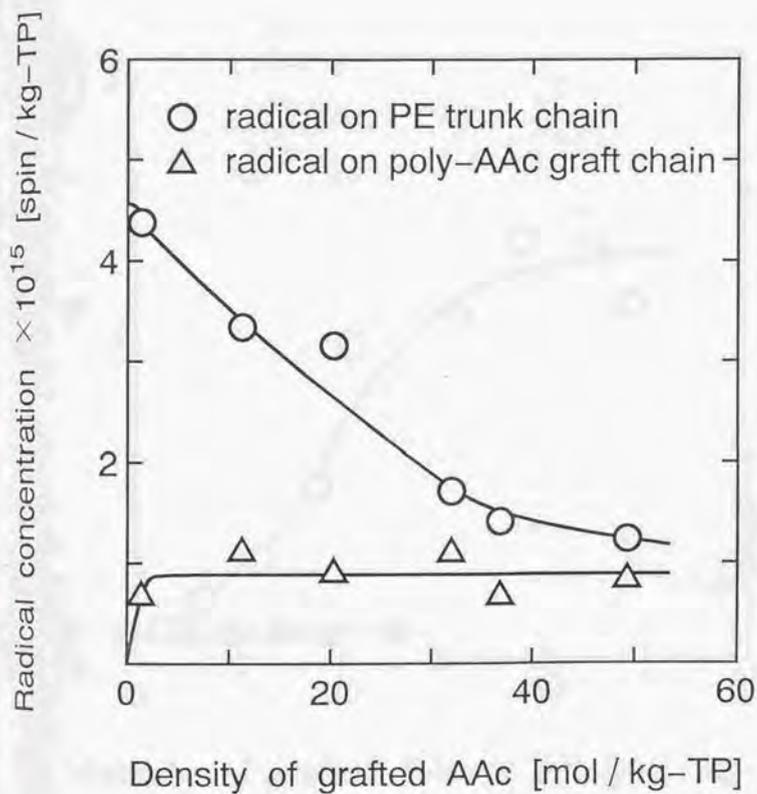


Fig. 2-4. Radical concentrations on the poly-AAc graft chain and PE trunk chain.
AAc = acrylic acid; PE = polyethylene

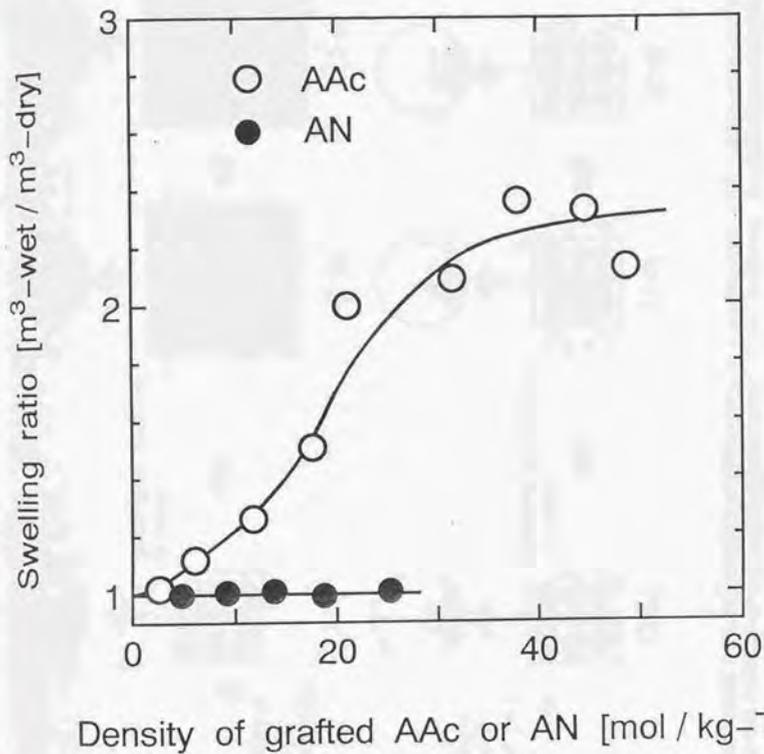


Fig. 2-5. Swelling ratio vs the density of the poly-AAc and poly-AN graft chains.
 AAc = acrylic acid; AN = acrylonitrile

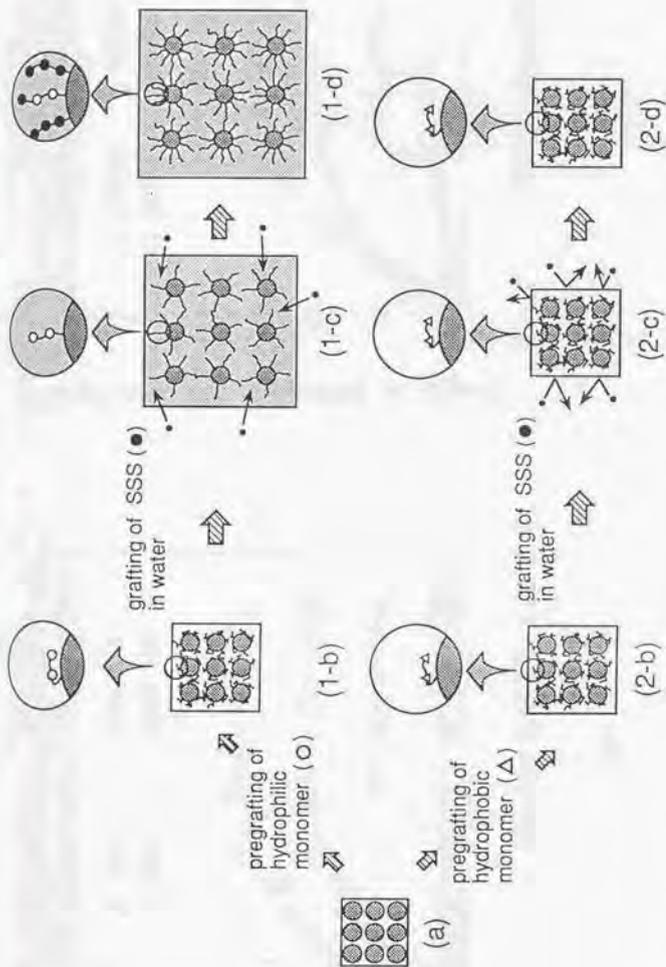
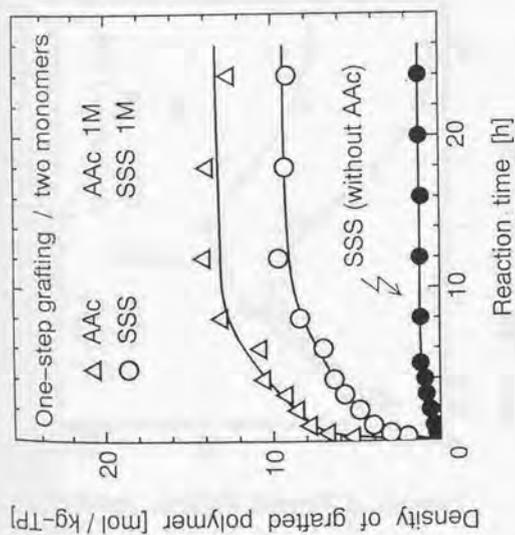
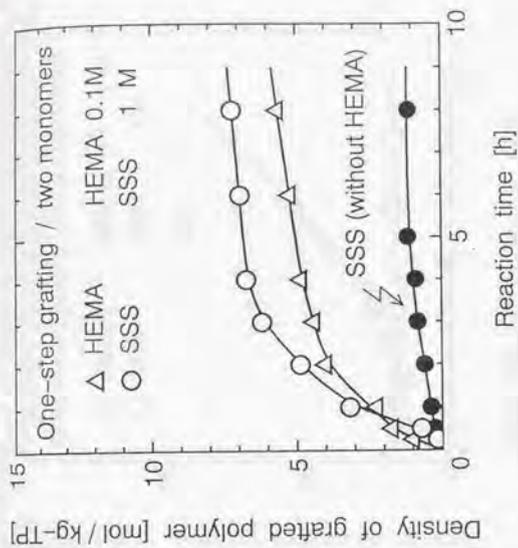


Fig. 2-6. Schematic illustrations of the enhancement of SSS grafting by hydrophilization of PE. (a) PE matrix consists of crystallites (●) and amorphous domain (white part); (1-b) hydrophilic monomer (O) was pregrafted. Pregraft chains stem from the surface of the crystallites in preirradiation technique; (1-c) hydrophilic pregraft chain swells in an aqueous SSS solution. Swelling enhances the access of SSS in amorphous domain to the radical site; (1-d) SSS was grafted. (2-b) hydrophobic monomer (Δ) was pregrafted; (2-c) hydrophobic pregraft chain does not swell in an aqueous SSS solution. The access of SSS in amorphous domain is restricted; (2-d) SSS was not grafted.



(a)



(b)

Fig. 2-7. Co-grafting rate of SSS onto the PE membrane. (a) AAC/SSS combination; (b) HEMA/SSS combination. AAC = acrylic acid; HEMA = hydroxyethyl methacrylate; SSS = sodium styrene sulfonate.

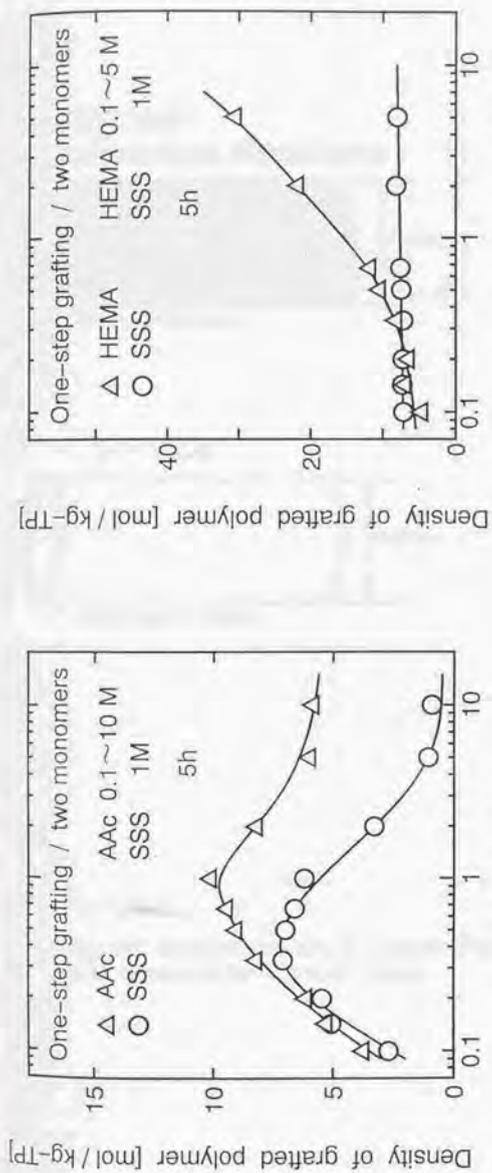
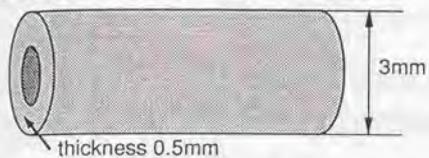


Fig. 2-8. Dependence of density of SSS grafted on the membrane on the molar ratio of hydrophilic monomer to SSS in the monomer mixture. (a) AAC/SSS combination; (b) HEMA/SSS combination. AAC = acrylic acid; HEMA = hydroxyethyl methacrylate; SSS = sodium styrene sulfonate.

microporous
PE hollow-fiber membrane



PE/PP nonwoven fabric



PP tube



PTFE film



Fig. 2-9. Appearances and dimensions of trunk polymers in hollow fiber, tube, nonwoven fabric and film forms.

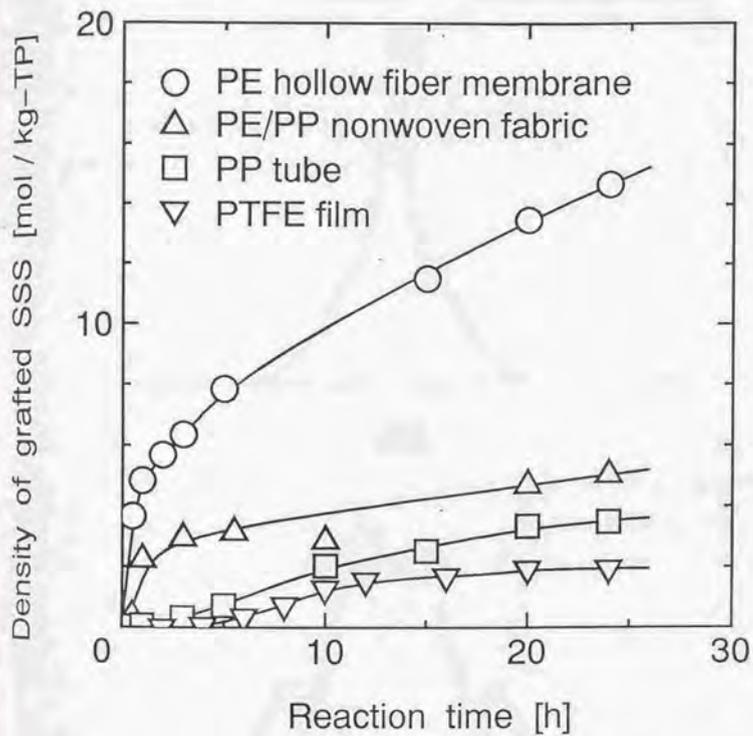
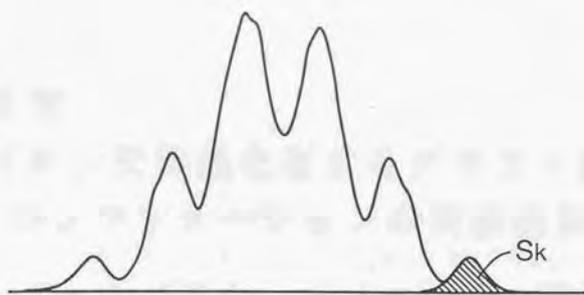
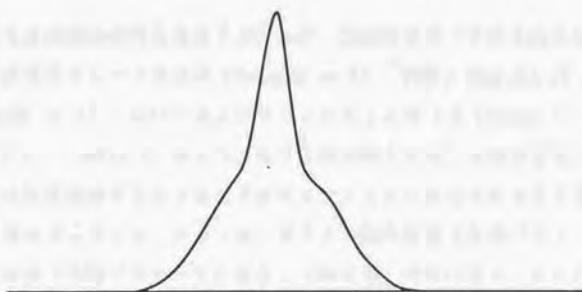


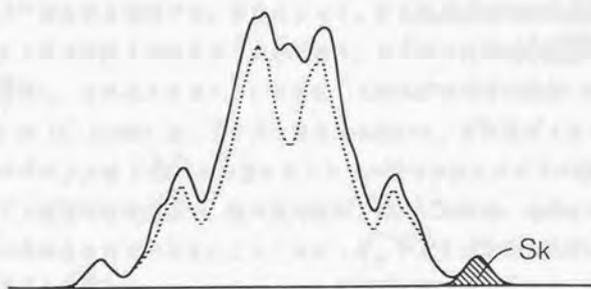
Fig. 2-10. Time course of cografting of SSS with AAc onto various trunk polymers.



(a)



(b)



(c)

Fig. 2-11 ESR spectra of integral form. (a) PE; (b) poly-AAc; (c) AAc-pregrafted PE. The spectra (a) was interposed in spectra (c).

第3章

イオン交換基を有するグラフト鎖の コンフォメーションの実験的解明

3-1 緒言

新規の分離機能材料を開発するために、放射線グラフト重合法を適用して、多孔性膜基材にキレート形成基 (Tsuneda et al., 1991; Konishi et al., 1992; Yamagishi et al., 1991) およびアフィニティリガンド (Iwata et al., 1991b; Kim et al., 1991a, b) をもつグラフト鎖を導入することができる。合成された材料の分離性能はグラフト高分子鎖のコンフォメーションに大きく依存する。グラフト鎖のコンフォメーションは、グラフト鎖の性質 (内部パラメータ) と透過溶液の性質 (外部パラメータ) によって決まる。内部パラメータとして、モノマーの種類、グラフト鎖の長さ、グラフト鎖密度および官能基密度がある。また、外部パラメータとして、溶媒の種類や組成、pH、イオン強度および温度がある。多孔性膜基材にグラフト鎖を導入して、水や有機溶媒の透過流束、溶質の拡散係数および阻止率を測定する。それによって、多孔性膜基材の細孔内に形成されたグラフト鎖の特性を推察することができる。グラフト重合法を用いて多孔性膜基材を修飾し、その透水性能について検討した既往の研究をTable3-1にまとめた。

Ito et al. (1990) は、プラズマ重合法を用いて、多孔性ポリカーボネート膜にカルボキシル基 (-COOH) を有するアクリル酸およびメタクリル酸を重合した。グラフト重合量を変化させ、膜の透過流束を測定した結果、透過させる溶液のpHが低いほど透過流束が大きかった。アクリル酸重合膜はpH=3付近で、メタクリル酸重合膜はpH=4付近で、それぞれ膜の透過流束に大きな変化が見られた。彼らは、グラフト重合反応という一段階の反応で、グラフト鎖にカルボキシル基を導入しているため、カルボキシル基密度が変化することは、グラフト鎖密度が変わることに相当する。したがって、グラフト鎖の伸縮における官能基密度

依存性およびグラフト鎖密度依存性を区別して考察することができない。また、プラズマをラジカル生成の励起源として用いているために、グラフト鎖は基材の外部表面にのみ形成し、基材の内部孔表面には形成しない (Fig. 3-1(c))。

本章では、放射線グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン膜にエポキシ基を有するグリシジルメタクリレート (GMA) をグラフト重合し、ひき続きジエチルアミノ (DEA) 基 ($-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) に変換した。このようにグラフト重合反応とイオン交換基導入反応という二段階の反応によって、グラフト鎖密度を一定に保ちながら、イオン交換基密度を広い範囲で変えることができるという点に特色がある。また、電子線というエネルギー密度の非常に高い励起源を用いて高分子基材にラジカルを生成させるので、グラフト鎖は基材の細孔内まで均一に分布する (Fig. 3-1(d))。

本章で使用した多孔性ポリエチレン膜は、マトリクスと細孔から成っている。マトリクスは、さらに結晶部とアモルファス部に分けられる。放射線グラフト重合をおこなった場合、グラフト鎖は結晶表面から成長する。このうち、アモルファス部の中で成長していくものもあれば、細孔内に向かって成長するものもある。結果的にグラフト鎖が位置する場はアモルファス部内部と細孔表面部に分類できる。ここでは、膜の体積膨張は、アモルファス部にあるグラフト鎖が膨潤するために起こり、透水性能の低下は細孔表面部にあるグラフト鎖が膨潤し、細孔を塞ぐために起こると考えた。そして、グラフト鎖の挙動は、その形成部位によって異なるとして、膜の体積変化からマトリクスに形成したグラフト鎖の挙動を、膜の透過流束から細孔部に形成したグラフト鎖の挙動を考察した。

本章の目的は次の2点である。(1)放射線グラフト重合法によって、多孔性膜にジエチルアミノ基をもつグラフト鎖を導入する。このとき、グラフト鎖密度が一定で、DEA基密度が異なるグラフト鎖を有する膜を合成すること、および(2)水およびアセトンという性質の異なる溶媒を透過させたときの膜の透過流束および体積膨張率を測定し、グラフト鎖の伸縮挙動について考察することである。

1) DEA基を有する多孔性膜の合成

基材として内径1.95mm、外径3.01mm、平均孔径0.34 μ m、空孔率71%のポリエチレン製中空糸状精密濾過膜(旭化成工業(株)製)を用いた。放射線グラフト重合法を適用して、基材にグリシジルメタクリレート(GMA)をグラフト重合した。さらに、ジエチルアミンとの反応により、GMAグラフト鎖中のエポキシ基の一部をジエチルアミノ(DEA)基に変換した。この反応経路をFig.3-2に示す。GMAのグラフト重合反応は前照射液相法を適用し、以下のような手順でおこなった。まず、長さ10cmの基材に窒素雰囲気下で電子線を照射してラジカルを生成させた。電子線照射は、カスケード型電子加速器(ダイナミトロン製 IEA-300-25-2型)を用い、加速電圧2MeV、電子線電流1mAの条件で、200kGy照射した。その後、照射した基材をガラスアンブルに入れ、アンブル内を真空に保った。窒素ガスのパブリングにより溶存酸素をあらかじめ除去しておいた5, 10, 40v/v%のGMA/メタノール液をアンブル内に注入した。アンブルを40℃の恒温槽中に置いて反応をおこなった。ここで、反応時間を変えて、膜のグラフト率を変化させた。グラフト率は以下の式で定義される。

$$\text{グラフト率(dg)} = 100[(W_1 - W_0)/W_0] \quad [\%] \quad (3-1)$$

ここで、 W_0 、 W_1 はそれぞれ基材、グラフト重合後の膜の重量である。グラフト重合後、膜をジメチルホルムアミド(DMF)溶液に浸してGMAのホモポリマーを除去した。メタノールで洗浄後、真空乾燥をおこない、重量を測定した。以後、GMAをグラフト重合した膜をGMA(dg)膜と表記する。()内の数字はグラフト率を表す。

GMA膜へのDEA基の導入反応は、50v/v%ジエチルアミン水溶液にGMA膜を投入して、30℃でおこなった。反応時間を変えてDEA基密度を変化させた。DEA膜中のDEA基密度およびGMA膜中のエポキシ基からDEA基への転化率 X を以下の式で定義した。

$$X = 100[142(W_2 - W_1)/73(W_1 - W_0)] \quad [\%] \quad (3-2)$$

$$\text{DEA基密度} = X(W_1 - W_0)/142/W_2 \quad [\text{mol/kg-TP}] \quad (3-3)$$

ここで、 W_2 はDEA基導入後の膜の重量、142および73という数値はGMAおよびジエチルアミンの分子量である。ここで、TPはTrunk Polymer(基材)の意味である。膜を水で洗浄した後、真空乾燥し、重量を測定した。以後、GMA膜中のエポキシ基を

DEA基に変換した膜をDEA(dg/X)膜と表記する。()内の前、後の数字はそれぞれグラフト率、転化率を表す。さらに、架橋したグラフト鎖を有するDEA膜を合成する場合、乾燥したDEA膜に窒素雰囲気下で500kGyの電子線を照射した。

2) DEA膜の物性

GMA(dg)膜およびDEA基導入後のDEA(100/X)膜の内径、外径および長さを水およびアセトンに濡らした状態で測定した。内径および外径の測定には光学顕微鏡、長さの測定には定規を用いた。

つぎに、DEA(100/30, 60, 95)膜の断面を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。さらに、膜厚方向におけるDEA基の分布を調べるために、DEA(100/95)膜を1M塩酸中に一昼夜浸すことによって、DEA基にClイオンを吸着させ、その分布をX線マイクロアナライザー(JEOL製, JXA-733)により測定した。

3) DEA膜の透過流束

DEA膜の透過流束測定装置をFig. 3-3に示す。30℃に保たれた恒温槽中で、U字型に張った中空糸膜に0.1MPaの透過圧力で液を膜の内面から外面に透過させた。所定時間内に透過した液の体積を測定して、膜内面積基準の透過流束を算出した。膜の目づまりによる透過流束の低下を防ぐために、透過させる液は、水の場合は限外濾過モジュール(旭化成工業(株)製, SIP1013)で濾過した水、アセトンの場合は平均孔径0.22 μm の精密濾過膜(旭化成工業(株)製, PS303)で濾過した液を用いた。また、透過流束を測定する前に、つぎのように膜の前処理をおこなった。まず、乾燥した膜を室温でメタノールに10分間浸したのち、水で置換した。次に、膜に1MのNaCl水溶液を10分間透過させ、初期のグラフト鎖のコンフォメーションを一定に整えた。

4) DEA膜の見かけの細孔径の推算法

膜の透過流束とグラフト鎖のコンフォメーションとの関係について考察するためにHagen-Poiseuilleの式を用いた。モデルを単純化するため、中空糸膜の細孔は一定の細孔径をもつまっすぐな円筒であると仮定した。実際の細孔は、膜内で三次元の網目状構造を形成している。したがって、見かけの細孔径は屈曲率を含

んだ値となっている。基材およびグラフト重合後の膜の透過流束は以下のように表される。

$$F_0 = n_0 \pi r_0^4 \Delta P / 8 \mu D_{T_0} \quad [\text{m/sec}] \quad (3-4)$$

$$F = n \pi r^4 \Delta P / 8 \mu D_T \quad [\text{m/sec}] \quad (3-5)$$

よって、

$$F/F_0 = (n/n_0)(r/r_0)^4(D_{T_0}/D_T) \quad [-] \quad (3-6)$$

ここで、 n は膜内面積あたりの細孔数、 r は細孔相当半径、 D_T は膜厚、 μ は液の粘度、 ΔP は膜の透過圧力を示す。グラフト重合の前後で、全細孔数が一定であると仮定すると、

$$n_0 d_{i_0} L_0 = n d_i L \quad [-] \quad (3-7)$$

ここで、 d_i は中空糸膜の内径、 L は中空糸膜の長さである。無次元化した細孔相当半径、すなわち基材に対するグラフト重合膜の細孔相当半径の比は以下の式で与えられる。

$$r/r_0 = [(F/F_0)(d_i L/d_{i_0} L_0)(D_{T_0}/D_T)]^{1/4} \quad [-] \quad (3-8)$$

(3-8)式の右辺は実験的に求められるので、これより r/r_0 の値が算出できる。

3-3 結果と考察

1) DEA膜の合成

多孔性ポリエチレン膜へのGMAグラフト重合反応におけるグラフト率の経時変化をFig. 3-4に示した。メタノール溶媒中のGMAモノマー濃度が高いほどグラフト重合速度が大きかった。GMAモノマー濃度10v/v%でグラフト重合をおこない、グラフト率100%、すなわちグラフト鎖密度7.0mol/kg-TPを有するGMA(100)膜を以下の実験に用いた。

多孔性ポリエチレン膜に導入したGMAグラフト鎖中のエポキシ基からジエチルアミノ(DEA)基への変換反応における転化率の経時変化をFig. 3-5に示す。エポキシ基からDEA基への変換反応の最終転化率は10時間で95%まで達した。また、変換反応時間を変えることによって、グラフト鎖密度を一定に保ちながら、DEA基の密度を0~6.7mol/kg-TPという広い範囲で変えることができた。

Fig. 3-6は総イオン交換容量から求めたDEA基密度と(3-3)式から求めたDEA基密度との比較である。両者は非常によく一致していることがわかる。これより、ジエチルアミンによるエポキシ基の開環反応にともなう膜の重量変化は、導入されたDEA基量に相当することが確認された。

Fig. 3-7はDEA膜の断面のSEM写真である。白い部分がマトリクス、黒い部分が細孔である。乾燥した状態では、グラフト率一定のDEA膜は、DEA基の密度が増加しても膜の細孔径はほとんど変化していないことがわかった。すなわち、DEA膜の透水性能は、細孔表面部に形成したグラフト鎖の液中でのコンフォメーションに依存することが推察される。

Fig. 3-8はDEA(100/95)膜のグラフト鎖に吸着したCl⁻イオンの吸着量分布をX線マイクロアナライザーで測定した結果である。Cl⁻イオンは膜厚方向に一様に分布していた。すなわち、膜中でDEA基の分布は膜厚方向に一様であった。

2) アモルファス部に形成したグラフト鎖の性質

多孔性ポリエチレン基材は、平均直径0.34 μ mの細孔がポリエチレンマトリクスに囲まれた構造をしている。さらにポリエチレンマトリクスは、結晶部とアモルファス部に分けることができる。結晶部はポリエチレンの高分子鎖がラメラ状に重なってできている。アモルファス部は結晶間に存在する。放射線グラフト重合法によってグラフト鎖が形成する部位は、アモルファス部と細孔表面部である。

Fig. 3-9はGMAグラフト重合反応後の膜の基材に対する湿潤状態での体積比を示したものである。グラフト率の増加とともにGMA膜の体積は直線的に増大した。細孔表面部に形成したグラフト鎖の体積排除による圧力は、膜全体を膨潤させるための圧力にはなり得ないので、膜の体積膨張はおもにアモルファス部にグラフト鎖が形成するために起こる。

Fig. 3-10は水およびアセトン中でのDEA(100/X)膜の基材に対する体積比を示したものである。転化率0%のDEA膜、すなわちGMA膜の体積は、アセトン中では水中の1.3倍である。これはアセトンが、アモルファス相にあるGMAグラフト鎖を膨潤させる作用、すなわち富溶媒作用をもっていることを示している。

水中でのDEA膜の体積は転化率の増大とともに直線的に増加している。この体積膨張は、アモルファス部にあるグラフト鎖中のエポキシ基にDEA基が導入されたこ

とによって起こる。一方、アセトン中のDEA膜の体積は、転化率20%までは減少し、20%を越えると増加した。これは、転化率の低い膜は残存しているエポキシ基の密度が高いので、GMA膜と同じようにアモルファス部にあるグラフト鎖がアセトン中で膨張するためである。このように、転化率20%以下のDEA膜は、水およびアセトンという異なった溶媒中で、アモルファス部にあるグラフト鎖の膨潤度が異なるために、同一の膜であっても体積膨潤に差が生じた。これに対し、転化率20%以上のDEA膜は、水およびアセトン中での体積に差は見られなかった。

3) 細孔表面部に形成したグラフト鎖の性質

GMA膜において、純水透過流束のグラフト率依存性をFig. 3-11に示す。グラフト率が200%を越えても透過流束の低下はほとんど見られなかった。また、グラフト率と(3-8)式から算出される r/r_0 値との関係もプロットした。これより、以下の考察が導かれる。グラフト率の増加とともにグラフト鎖は細孔を埋めていくけれども、Fig. 3-10で示されたようにアモルファス相に形成したグラフト鎖による体積膨張があるため、細孔を埋める効果が相殺され、結果的に基材よりも細孔径の大きいグラフト重合膜を得ることができた。さらに、基材と同程度の透過流束が維持されたということは、実用的見地から非常に望ましい。メタノールを溶媒とするグラフト重合法が有効であることを確認した。

基材にアセトンおよび水を透過させたときの透過流束の比は、(3-4)式から予想されように両液の粘度の比の逆数に一致した。ただし、30°Cにおける粘度はアセトンが 2.7×10^{-4} Pa-sec、水が 8.0×10^{-4} Pa-secである。これに対し、GMA膜の透過流束は粘度だけからでは説明できない。DEA(100/X)膜に純水およびアセトンを透過させたときの透過流束の転化率依存性をFig. 3-12(a)に示す。転化率の増加に伴い、純水の透過流束は低下した。アセトンの場合、転化率20%付近まで透過流束はいったん上昇し、その後低下した。

DEA膜の基材に対する細孔相当半径比 r/r_0 の転化率依存性をFig. 3-12(b)に示す。純水を透過させたときの r/r_0 値は、転化率40~60%の範囲で大きく低下した。これは、純水中でDEA基が解離するために、細孔表面部のグラフト鎖が自身のもつ同種の電荷(+)の反発作用によって膨潤し、細孔を塞ぐからである。一方、アセトンを透過させたときの r/r_0 値は、転化率によらず1~1.2という値を示した。

4) 架橋構造をもったグラフト鎖の性質

一般に、高分子鎖に放射線を照射すると、ラジカルの生成により、高分子鎖に対して、架橋や分解などの効果を引き起こす。電子線によってグラフト鎖に架橋構造をもたせたDEA膜の純水透過流束をFig. 3-13に示し、非架橋のDEA膜の透過流束と比較した。グラフト鎖を架橋することによってDEA膜の透過流束は向上した。これは、細孔表面部にあるグラフト鎖の伸縮運動が制限されたためである。特に、転化率70%以上のDEA膜では、架橋によって純水透過流束が10倍以上向上することがわかった。Saito et al. (1989a) は、リン酸基を導入した膜に放射線架橋をすることによって、透過流束が向上することを示した。また、架橋剤であるジビニルベンゼン(DVB)を共グラフト重合することによって、透過流束をさらに向上できるとも報告している(Saito et al., 1989b)。

5) グラフト鎖の伸縮の可逆性

GMA膜およびDEA(100/95)膜にアセトンと水を交互に透過させときの透過流束をFig. 3-14に示す。ここでは溶液の粘度を補正するために、GMA膜およびDEA膜の透過流束を、同じ液を基材に透過させたときの透過流束で割り、基準化した。GMA膜の場合、アセトンよりも純水を透過させたときの透過流束の方が高い。これに対し、DEA膜の場合、純水を透過させたときの透過流束は、アセトンのときの1/10以下である。しかしながら、いずれの場合も5回の繰り返しで透過流束の変化は可逆的であった。

Okahata et al. (1987) は、グラフト膜のスイッチ機能性について検討している。彼らは、多孔性ナイロンカプセルに、ビニルピリジンおよびメタクリル酸をグラフト重合し、得られるカプセルのNaCl透過性は、pHの値によって大きく変化することを見いだした。また、このカプセルをpH=2とpH=9の外部環境に交互に置いたとき、NaCl透過性は4回の繰り返しでも可逆的に変化した。

透過流束の変化は細孔表面部にあるグラフト鎖の伸縮運動に起因することから、グラフト鎖の伸縮運動は可逆的であるといえる。このような可逆的な伸縮運動性は、高分子電解質溶液中の高分子鎖や、イオン性のゲルを構成する高分子鎖にも見られる現象である。高分子溶液中の高分子鎖が、両端が自由な高分子鎖である

とすると、グラフト鎖は一端を固定された高分子鎖であり、ゲル中の高分子鎖は両端を固定された高分子鎖である。高分子鎖の可逆的な伸縮運動性は、高分子鎖の拘束状態に依存しない共通の性質であることが確認された。

このように、多孔性基材に導入したグラフト鎖が、透過させる溶液の性質によって、可逆的にコンフォメーションを変える現象は、溶液や溶質の透過性を制御できるという点で応用範囲が広く、ドラッグデリバリーシステム(DDS) (Okahata et al., 1987) やスイッチ機能膜 (Tsuji et al., 1990; Ito et al., 1990) などに応用できる。

3-4 結言

放射線グラフト重合法を適用して、多孔性ポリエチレン膜にグリシジルメタクリレート (GMA) をグラフト重合し、続くジエチルアミンとの反応でGMAグラフト鎖中のエポキシ基をジエチルアミノ (DEA) 基に変換した。グラフト鎖は、膜の細孔表面およびマトリクスのアモルファス内部に形成する。細孔表面部に形成したグラフト鎖の伸縮挙動は膜の透過流束を決定し、一方、アモルファス部に形成したグラフト鎖の伸縮挙動は膜の体積を決定する。本章では、グラフト鎖密度を一定に保ち、グラフト鎖中のDEA基密度を広い範囲 (0~6.7mol/kg-TP) で変えて膜を合成した。膜の透過流束および体積を測定し、グラフト鎖の伸縮について考察した結果、以下の知見を得た。

(1) 水およびアセトンの透過流束は、DEA基密度に大きく依存した。水の場合、転化率40~60%付近で透過流束は急激に低下した。アセトンの場合、転化率20%付近まで透過流束はいったん上昇し、その後、低下した。

(2) Hagen-Poiseuilleの式を用いて、DEA膜の基材に対する細孔相当径の比 r/r_0 を求めた。水を透過させた場合、 r/r_0 は転化率40~60%で急激に減少し、転化率95%では0.33であった。一方、アセトンを透過させた場合、 r/r_0 の値は1~1.2を維持し、転化率にはほとんど依存しなかった。

(3) DEA膜にさらに500kGyの電子線を照射した。グラフト鎖の架橋により、その伸長が制限され、透過流束は向上することがわかった。

(4) DEA膜に水とアセトンを交互に透過させた。5回の繰り返しでも水およびアセトンの透過流束はそれぞれ一定値を保った。グラフト鎖の伸縮は可逆的に起こることがわかった。

使用記号

D_r	中空糸膜の膜厚 [m]
d_i	中空糸膜の内径 [m]
dg	GMAグラフト率 [%]
F	GMA膜およびDEA膜の透過流束 [m/sec]
L	中空糸膜の長さ [m]
n	膜内面積あたりの細孔数 [m ⁻²]
ΔP	透過圧力 [Pa]
r	膜の細孔相当半径 [m]
V	GMA膜およびDEA膜の膜体積
W_0	基材の重量 [kg]
W_1	GMA膜の重量 [kg]
W_2	DEA膜の重量 [kg]
X	エポキシ基からDEA基への転化率 [%]
μ	溶液の粘度 [Pa·sec]

添字

0 基材

引用文献 (第3章)

- Bellobono, I. R.; Selli, E.; Righetto, L. "Flow Dynamical Characterization of Sorbents Immobilized as Composites in Membranes Prepared by Photochemical Grafting onto Polymers." *Water. Chem. Phys.* 19, 131 (1988).
- Ito, Y.; Kotera, S.; Inaba, M.; Kono, K.; Imanishi, Y. "Control of Pore Size of Polycarbonate Membrane with Straight Pores by Poly(acrylic acid) Grafts." *Polymer*, 31, 2157 (1990).
- Iwata, H.; Oodate, M.; Uyama, Y.; Amemiya, H.; Ikada, Y. "Preparation of Temperature-Sensitive Membranes by Graft Polymerization onto a Porous Membrane." *J. Membr. Sci.* 55, 119 (1991a).
- Iwata, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Adsorption Characteristics of an Immobilized Metal Affinity Membrane." *Biotechnol. Prog.* 7, 412 (1991b).
- Kim, J. T.; Anderson, J. L. "Hindered Transport through Micropores with Adsorbed Polyelectrolytes." *J. Membr. Sci.* 47, 163 (1989).
- Kim, M.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sato, T.; Sugo, T.; Ishigaki, I. "Adsorption and Elution of Bovine γ -Globulin Using an Affinity Membrane Containing Hydrophobic Amino Acids as Ligands." *J. Chromatogr.* 585, 45 (1991a).
- Kim, M.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I. "Protein Adsorption Capacity of a Porous Phenylalanine-Containing Membrane Based on a Polyethylene Matrix." *J. Chromatogr.* 586, 27 (1991b).

- Xonishi, S.; Saito, K; Furusaki, S.; Sugo, T. "Sorption Kinetics of Cobalt in Chelating Porous Membrane." *Ind. Eng. Chem. Res.* 31, 2722 (1992).
- Lim, S. L.; Fane, A. G.; Fell, C. J. D. "Radiation-Induced Grafting of Regenerated Cellulose Hollow-Fiber Membranes." *J. Appl. Polym. Sci.* 41, 1609 (1990).
- Okahata, Y.; Noguchi, H.; Seki, T. "Permeability Control of Polymer-Grafted Capsule Membranes Responding to Ambient pH Changes." *Macromolecules*, 20, 15 (1987).
- Osada, Y.; Honda, K.; Ohta, M. "Control of Water Permeability by Contraction of Poly(methacrylic acid)-Grafted Membranes." *J. Membr. Sci.* 27, 327 (1986).
- Saito, K; Kaga, T.; Yamagishi, H.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Phosphorylated Hollow Fibers Synthesized by Radiation Grafting and Cross-Linking." *J. Membr. Sci.* 43, 131 (1989a).
- Saito, K; Ito, M.; Yamagishi, H.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "A Novel Hollow Fiber for the Removal of Metal Ion during Permeation: Preparation by Radiation-Induced Cograftering of a Cross-Linking Agent with Reactive Monomer." *Ind. Eng. Chem. Res.* 28 1808 (1989b).
- Tsuji, T.; Konno, M.; Sato, S. "Permeation Mechanism for a Thermo-Sensitive Composite Membrane Composed of Porous Glass and N-Isopropylacrylamide." *J. Chem. Eng. Japan* 23, 447 (1990).

Tsuneda, S.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Metal Collection Using Chelating Hollow Fiber Membrane." *J. Membr. Sci.* 58, 221 (1991).

Yamagishi, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I.
"Introduction of a High-Density Chelating Group into a Porous Membrane without Lowering the Flux. *Ind. Eng. Chem. Res.* 30, 2234 (1991a).

Table 3-1. Previous studies on the permeability of porous materials modified by graft polymerization techniques.

Grafting	Trunk polymer	Monomer	Parameters		Applications	Reference
			Internal	External		
physical	mica membrane	SSS	pore radius	KCl conc.		Kim & Anderson (1989)
chemical	nylon capsule	MAc, AAc	monomer	pH	drug release device, artificial cells	Okahata et al. (1987)
chemical	porous glass	AAm, IPAAm		acetone conc., temperature	switching-functional membrane	Tsuji et al. (1990)
photo	cellulose filter	epoxydiacrylate		pH	gas-separation membrane	Belloboho et al. (1988)
plasma	polyvinyl alcohol membrane	MAc	solute		protein-separation membrane	Osada et al. (1986)
plasma	polycarbonate membrane	MAc, AAc	degree of grafting	pH	switching-functional membrane	Ito et al. (1990)
plasma	polyvinyliden fluoride membrane	IPAAm	copolymer	pH	temperature-sensitive membrane	Iwata et al. (1991)
gamma ray	cellulose hollow fiber	St, AN, etc.	monomer			Lim et al. (1990)
electron beam	polyethylene hollow fiber	GMA-DEA	density of the functional group	acetone, water	anion-exchange membrane	This study

Abbreviation of monomers: SSS = sodium styrenesulfonate, MAc = methacrylic acid, AAc = acrylic acid, AAm = acrylamide, IPAAm = isopropylacrylamide, St = styrene, AN = acrylonitrile, GMA = glycidyl methacrylate, DEA = diethyl amine

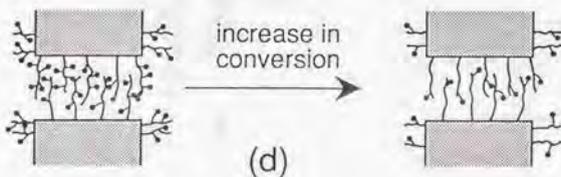
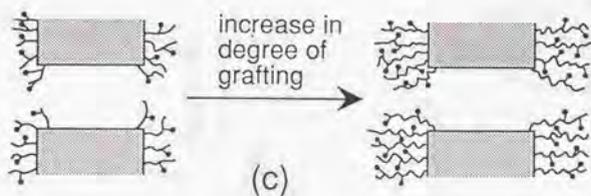
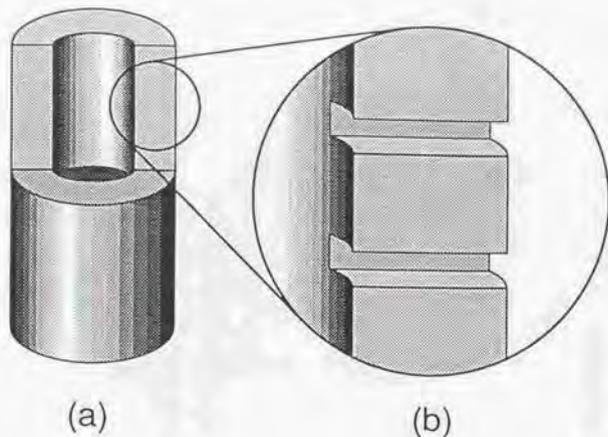


Fig. 3-1. Schematic illustration of the polymer chains grafted onto porous materials. (a) Porous hollow fiber, (b) Idealized porous structure, (c) Previous studies: (1) the variation in the density of the functional group correspond to that in the density of the graft chains, and (2) the grafted polymer branches are located near the membrane surface, (d) This study: (1) the variation in the density of the functional group is attainable at a constant graft chain density, and (2) the grafted polymer branches are uniformly distributed throughout the membrane.

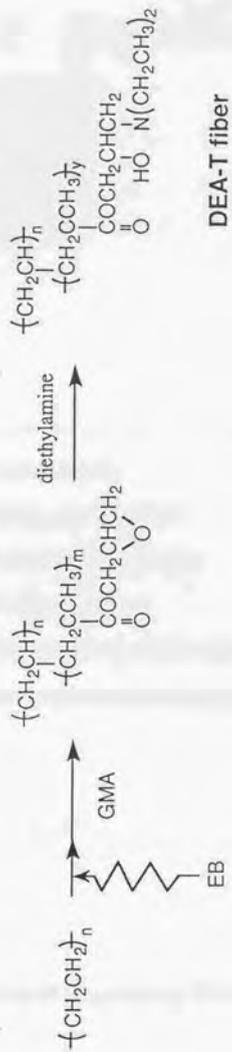
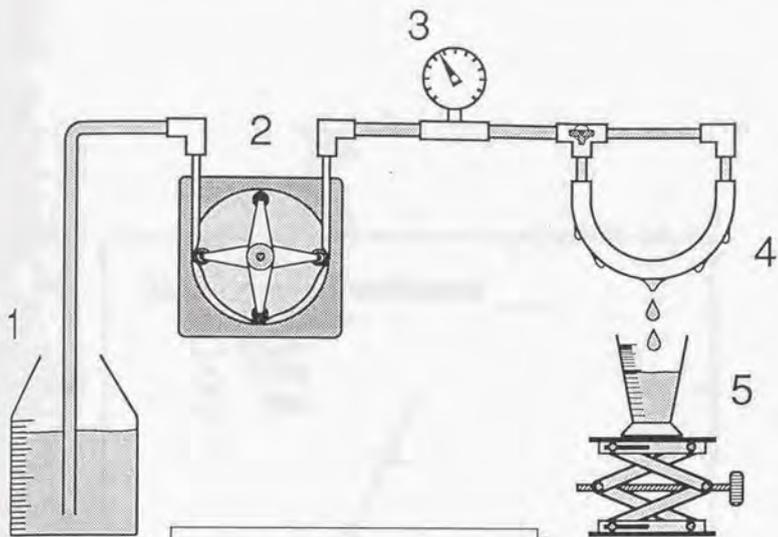


Fig. 3-2. Preparation scheme of DEA-group-containing hollow fiber membrane.



- 1 Feed tank
- 2 Flow controller
- 3 Pressure gauge
- 4 Hollow fiber
- 5 Measuring cylinder

Fig. 3-3. Experimental apparatus for flux measurement.

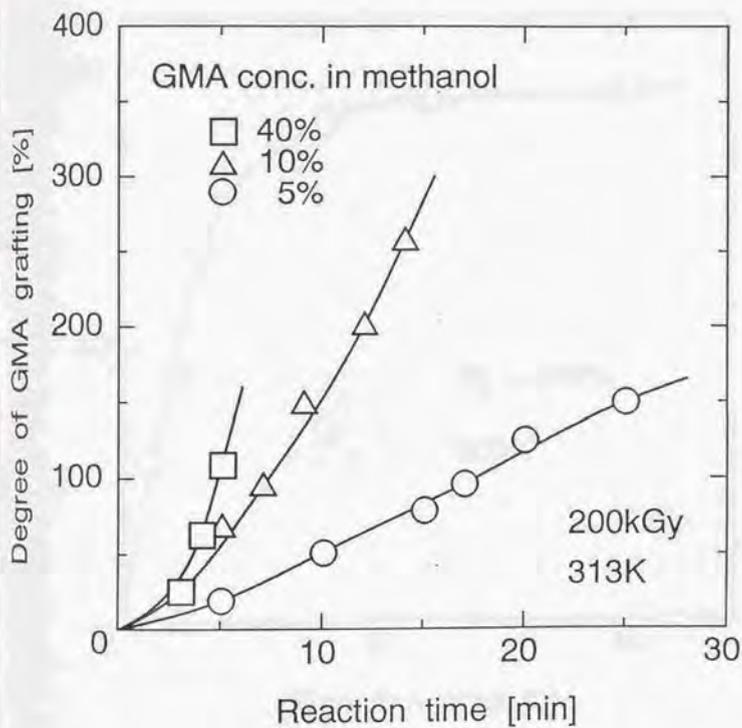


Fig. 3-4. Degree of GMA grafting vs reaction time of grafting in a GMA/methanol solution.

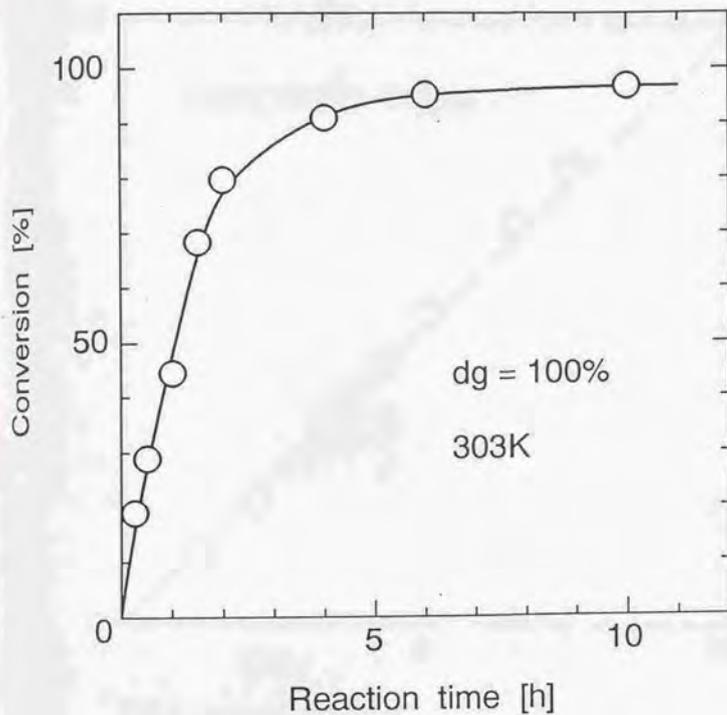


Fig. 3-5. Conversion of the epoxide group into a DEA group as a function of reaction time.

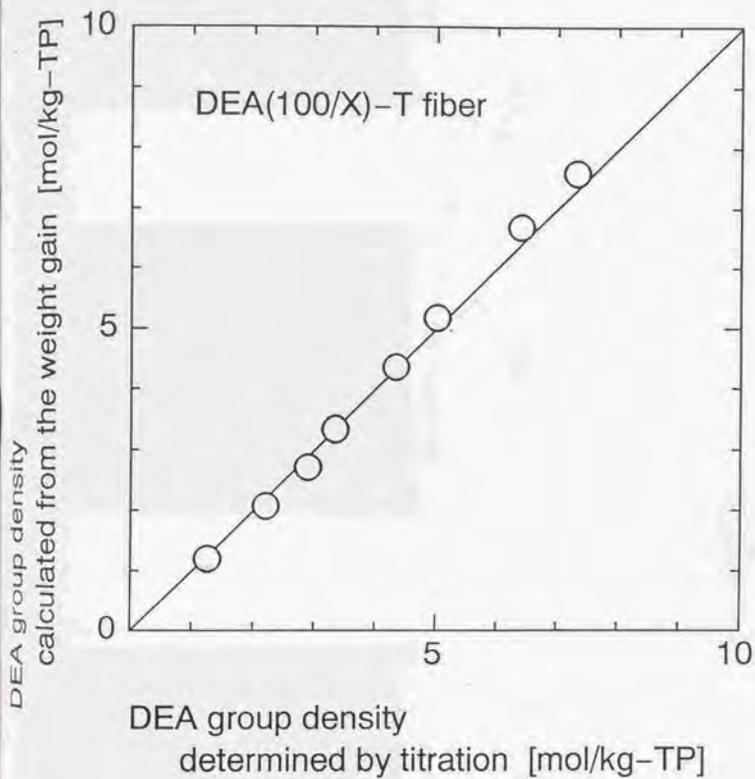
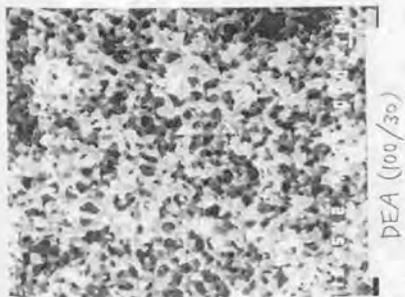
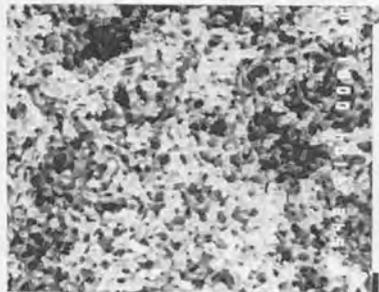


Fig. 3-6. DEA group density determined by the total ion-exchange capacity vs DEA group density calculated from the weight gain.



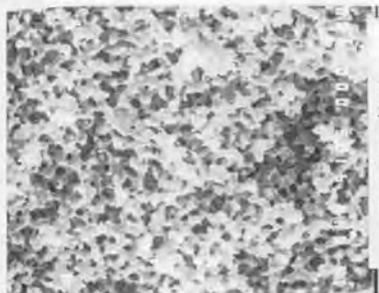
DEA (100/30)

(a)



DEA (100/60)

(b)



DEA (100/95)

(c)

I

Fig. 3-7. SEM pictures of a section of the DEA(100/X)-T fiber. length of bar = 1 micrometer. (a) X = 30%, (b) X = 60%. (c) X = 95%.

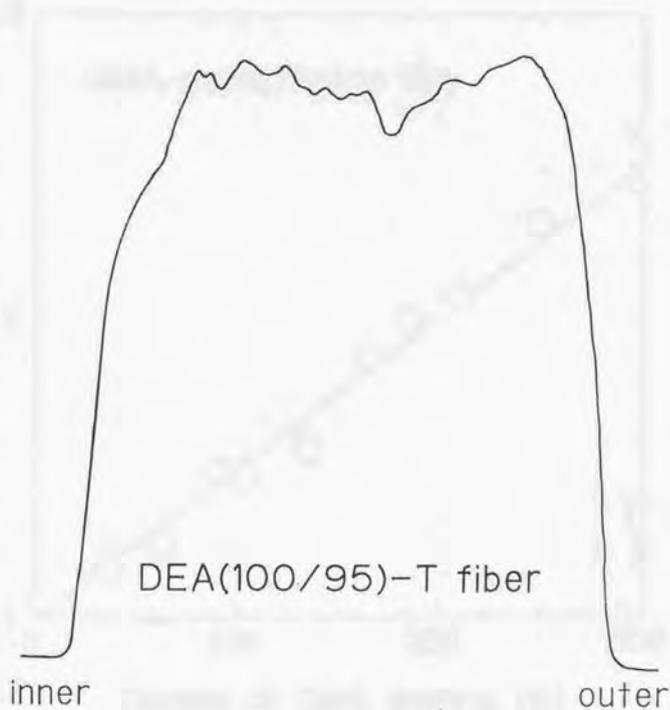


Fig. 3-8. XMA profile of chloride ion sorbed to the DEA group across the DEA(100/95)-T fiber.

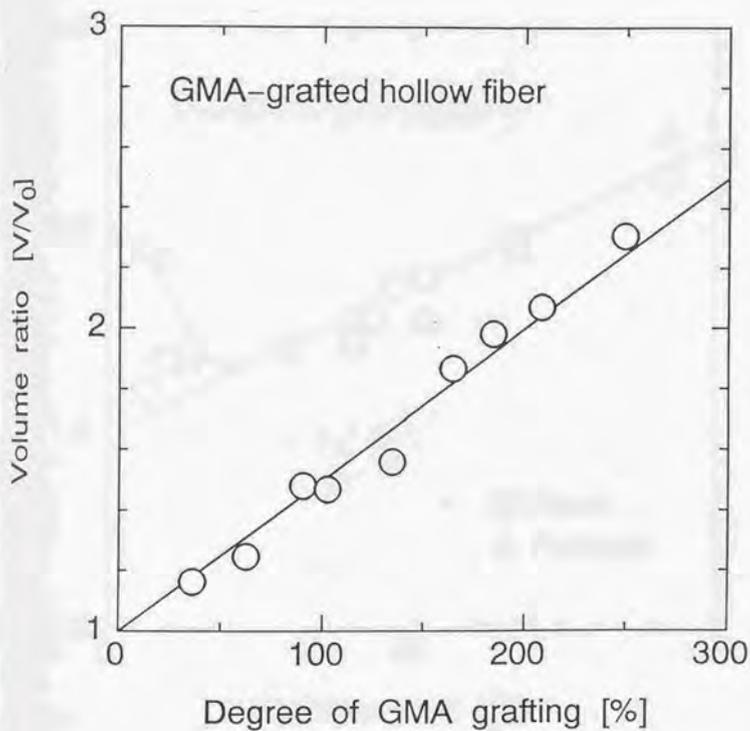


Fig. 3-9. Volume change accompanied by GMA grafting. V_0 is the volume of the starting hollow fiber.

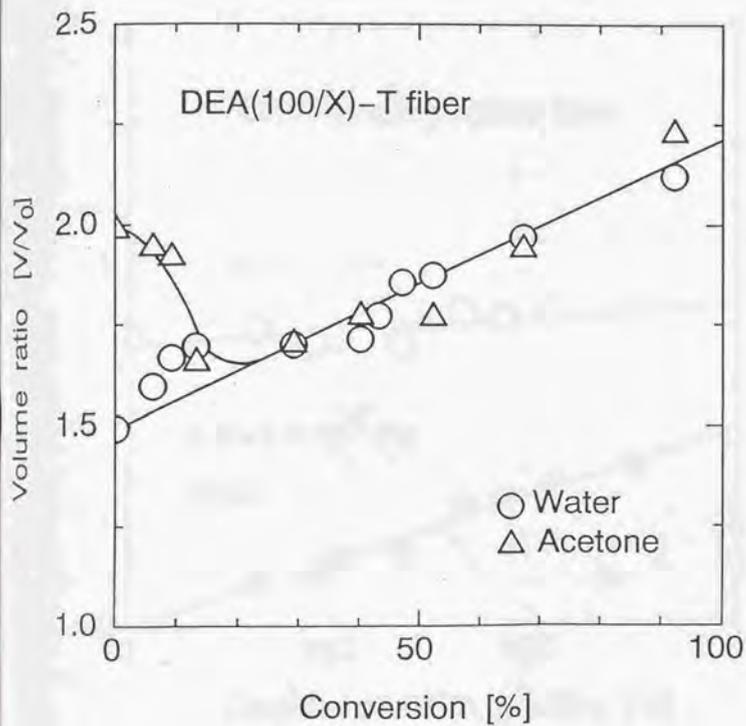


Fig. 3-10. Swelling ratio of the DEA(100/X)-T fiber in water and acetone. V_0 is the volume of the starting hollow fiber in water or acetone.

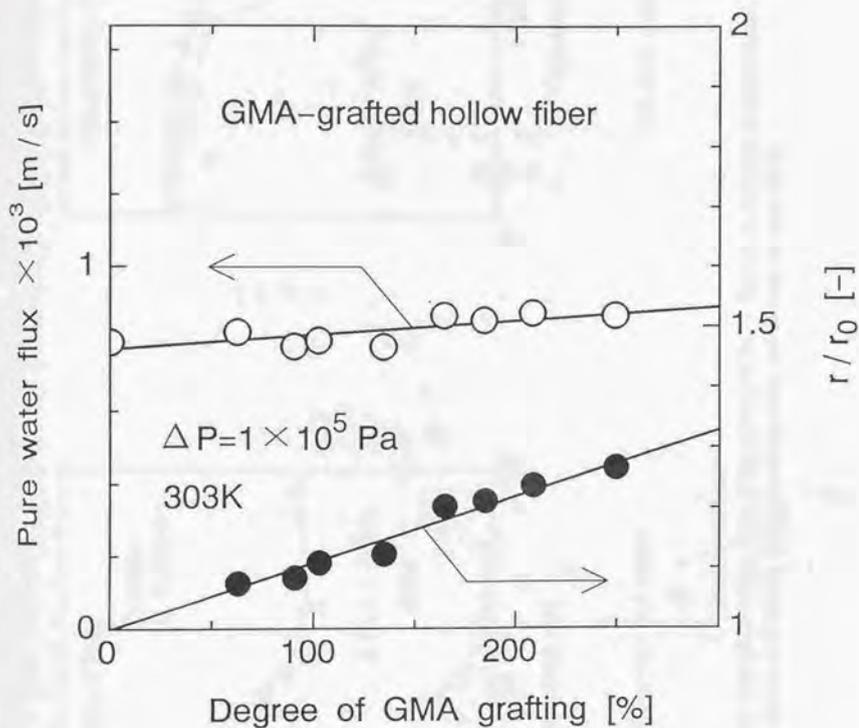
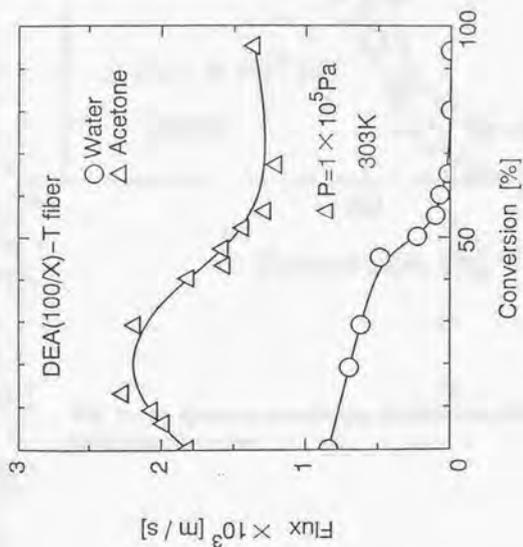
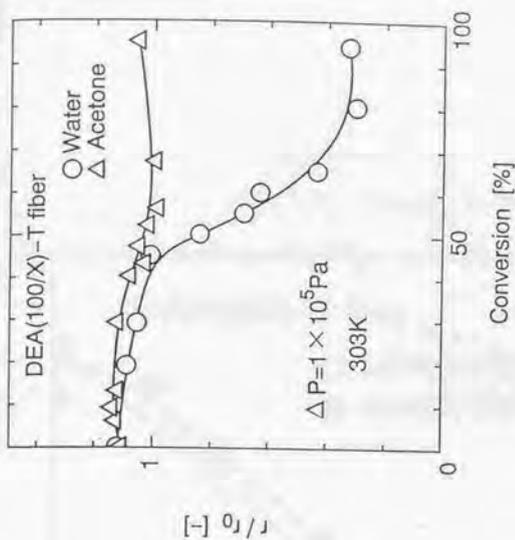


Fig. 3-11. Pure water flux and pore radius ratio of the GMA-grafted hollow fiber as a function of GMA grafting.



(a) Flux of acetone and water



(b) Pore radius ratio

Fig. 3-12. Flux and pore radius ratio of the DEA(100/X)-T fiber as a function of conversion.
(a) Flux of acetone and water; (b) pore radius ratio calculated by eqn. (3-8).

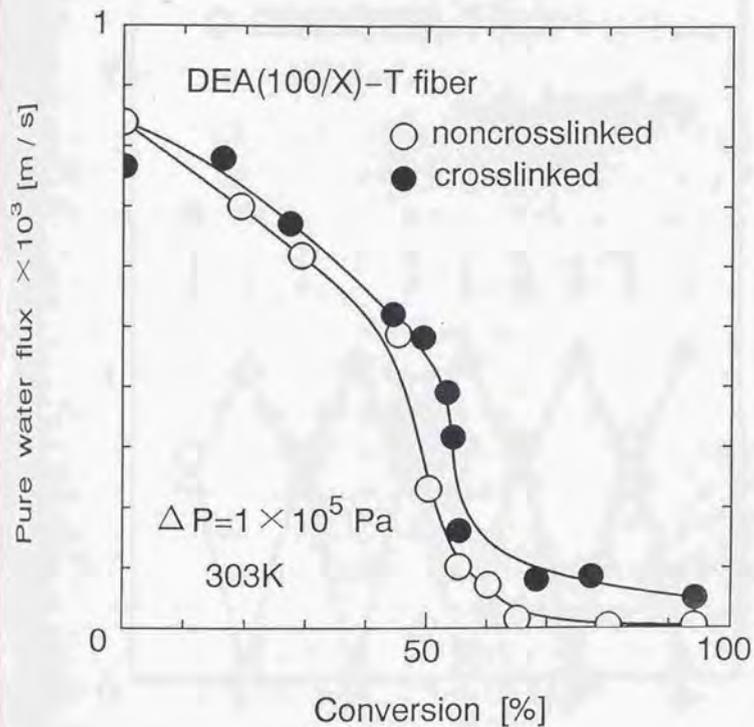


Fig. 3-13. Effect of crosslinking on the pure water flux of the DEA(100/X)-T fiber.

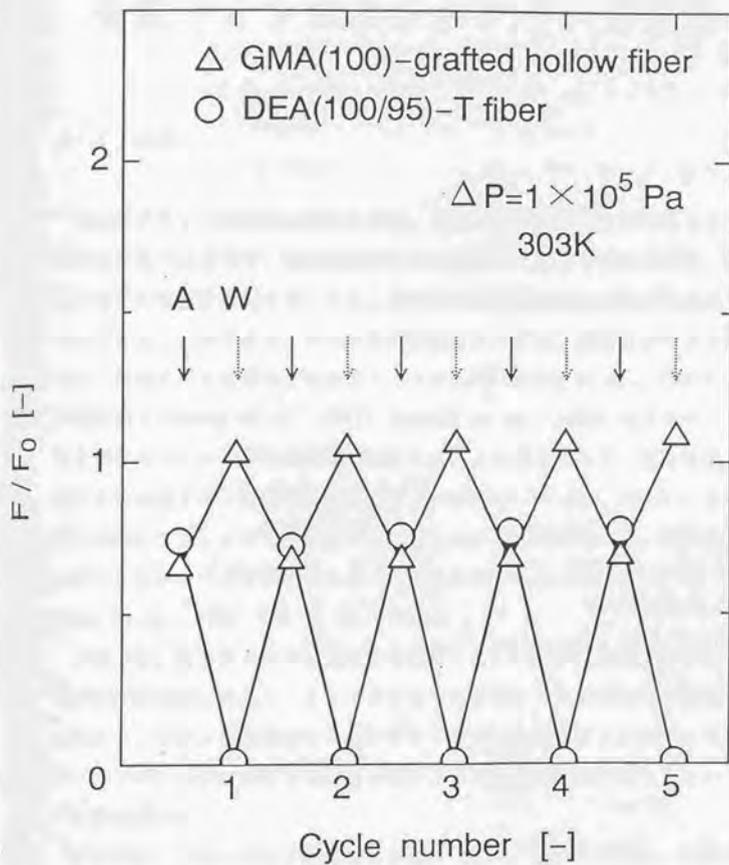


Fig. 3-14. Cycles of flux for alternate permeation of water and acetone. F_0 is the flux of the starting hollow fiber for water or acetone. The symbols of A and W denote acetone and water, respectively, which permeated across the hollow fiber.

第4章

スルホン酸基を有するグラフト鎖の 金属イオンおよびタンパク質吸着特性

4-1 緒言

放射線グラフト重合法は基材の形状、化学的安定性を保ちながらさまざまな官能基を付与できるので、機能性材料をつくるときに有効な方法である。分離機能性を有する精密濾過膜を用いると、液中の目的物質を膜の細孔内を通過する間につかまえることができる。われわれの研究グループは、放射線グラフト重合法により、金属イオンを捕集できるアミドキシム基 (Saito et al., 1987) やイミノジ酢酸基 (Tsuneda et al., 1991; Konishi et al., 1992) などのキレート形成基をポリエチレン製精密濾過膜に導入した。この膜を使って、拡散移動抵抗の無視できる金属イオン捕集が達成された (Yamagishi et al., 1991)。また、膜の細孔表面にアフィニティリガンドを固定した分離材料を用いて、拡散移動抵抗の無視できるタンパク質の捕集もおこなうことができる (Brandt et al., 1988; Iwata et al., 1991; Kim et al., 1991a)。

本章では、放射線グラフト重合法を適用して、イオン交換基を有するグラフト鎖を精密濾過膜に固定し、タンパク質を分離精製するための新規の膜を開発する。このとき、イオン交換基を有するグラフト鎖に、金属イオンに比べてサイズの大きいタンパク質がどのような速度でどのような容量で捕捉されるかという点は非常に興味深い。

本章では、ポリエチレン製精密濾過膜にスルホン酸基を導入し、金属イオンとタンパク質の吸着特性を比較検討する。本章の目的はつぎの2点である。

- (1) スルホン酸基をポリエチレン製精密濾過膜へ付与し、その物性 (透水性能、比表面積およびイオン交換容量) を測定する。
- (2) 金属イオンおよびタンパク質の吸着容量や吸着破過特性を比較する。

4-2 実験

1) 基材と試薬

市販のポリエチレン製中空糸状精密濾過膜(旭化成工業(株)製)をグラフト重合用の基材に用いた。この膜の物性は、内径1.95mm、外径3.01mm、公称孔径0.34 μ mおよび空孔率71%である。試薬には東京化成(株)製の特級グリシジルメタクリレート($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CHOCH}_2$, GMA)および2-ヒドロキシエチルメタクリレート($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, HEMA)、和光純薬工業(株)製の特級プロパンスルトン($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_2$)および亜硫酸ナトリウム(Na_2SO_3 , SS)、東ソー(株)製のスチレンスルホン酸ナトリウム($\text{CH}_2=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$, SSS)をそのまま用いた。タンパク質には、リゾチーム(和光純薬工業(株): Cat.No.126-02671)を用いた。

2) 基材へのスルホン酸基導入法

Fig. 4-1に示す3通りの経路で、ポリエチレン製精密濾過膜にスルホン酸基を導入した。いずれの場合も10cmの中空糸膜に常温、窒素雰囲気下で電子線を200kGy照射してラジカルを生成させ、その後グラフト重合反応をおこなった。

まず、第1の方法について説明する。照射した中空糸膜をあらかじめ脱気しておいた10v/v%のGMA/MeOH溶液に投入し、40℃でグラフト重合反応をおこなった。GMAグラフト重合反応の詳細は、第3章に記述した。基材に導入したGMAのグラフト重合量をグラフト率で定義した。

$$\text{GMAグラフト率 (dg)} = 100[(W_1 - W_0)/W_0] [\%] \quad (4-1)$$

ここで、 W_0 と W_1 はそれぞれ基材の重量およびGMAグラフト重合膜の重量である。ここでは、グラフト重合反応を10分間おこなうことにより、GMAグラフト率を150%に設定した。この膜を0.5Mの硫酸中に投入し、80℃で2時間反応をおこない、グラフト鎖中のエポキシ基を隣接した二つの水酸基、すなわちジオール(Diol)基に変換した(Hrudkova et al., 1977)。この膜をジオール(Diol)膜とよぶことにする。つづいて、プロパンスルトンとの反応により、ジオール膜の水酸基をスルホプロピル(SP)基($-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$)に変換した(Ribeiro et al., 1980; Azanova et al., 1990)。得られた膜をSP膜とよぶことにする。

第2の方法は、GMAグラフト重合膜を亜硫酸ナトリウム(SS)とイソプロパノール(IPA)の混合水溶液(SS/IPA/H₂O=10/15/75)に投入し、80°Cで所定時間反応をおこない、グラフト鎖中のエポキシ基をスルホン酸基(-SO₃H)に変換するという方法である。反応後、この膜を0.5Mの硫酸中に投入し、80°Cで2時間反応をおこない、グラフト鎖中に残存していたエポキシ基をジオール基に変換した。こうして得られた膜をSS膜とよぶことにする。

第3の方法は、照射した中空糸膜にスチレンスルホン酸ナトリウム(SSS)と2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)の共グラフト重合をおこなうことにより、スルホン酸基を導入する方法である。この方法の詳細は第2章に記述した。この方法で合成された膜をSSS膜とよぶことにする。

いずれの場合も、導入されたスルホン酸基の密度(d_{sp} , d_{ss} および d_{sss} と記す)は膜の中性塩分解容量を測定することによって求めた。この測定法については、第2章で述べた。

3) スルホン酸基を有する膜の物性

湿润状態のSP、SSおよびSSS膜の内径(d_i)および外径(d_o)を顕微鏡で、長さ(L)を定規で測定した。これらの測定値より、膜体積(V_m)を求めた。

また、SP、SSおよびSSS膜に純水を透過させたときの透過流束を測定した。測定法については第3章で記述した。

さらに、各膜を真空乾燥後、比表面積計(Quantasorb, Yuasa Ionics Co.)を用いて、窒素吸着法により、膜の比表面積(a_v)を測定した。

4) 透過法によるタンパク質の吸着実験

Fig. 4-2(a)に示すような装置を用いて、スルホン酸基を有する膜にリゾチームを含む溶液を透過させ、イオン交換によるタンパク質吸着実験をおこなった。

0.02Mリン酸バッファー(pH=6)にリゾチームを溶かし、0.5mg-Lysozyme/mLに調製した液を供給用のタンパク質溶液として用いた。室温で、輸注ポンプ(ATOM-235, ATOM Co.)を用いて、膜にリゾチーム溶液を透過させた。長さ約6cmの中空糸膜をI字状にセットし、タンパク質溶液を輸注ポンプの圧力で膜内面から外面に一定流量(10~100mL/h)で透過させた。膜外面から透過してきた液をフラク

ションコレクターによって分取し、各フラクションのリゾチーム濃度を280nmの吸光度を測定して求めた。透過液中のリゾチーム濃度が供給液中の濃度と等しくなったことを確認した後、膜にバッファーを10mL透過させ、膜細孔内の洗浄をおこなった。つぎに溶出液を透過させ、膜に吸着していたリゾチームを溶出させた。溶出液として、0.5M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファーを用いた。ここで、溶出率を以下の式で定義した。

$$\text{溶出率} = (\text{溶出したリゾチーム量}) / (\text{吸着したリゾチーム量} - \text{洗浄によって流出したリゾチーム量}) \times 100 \quad [\%] \quad (4-2)$$

5) 透過法による銅イオンの吸着実験

Fig. 4-2(b)に示すような装置を用いて、SP膜に銅イオンを含む溶液を透過させ、イオン交換による銅イオンの吸着実験をおこなった。

塩化銅 (CuCl_2) を水に溶かし、5mg-Cu/Lに調製した液 (pH=3.3) を供給用の銅イオン溶液として用いた。フローコントローラー (FC-103, Chuo Rika Co.) を用いて一定の透過圧力 (0.025~0.1MPa) のもとで、膜に銅イオン溶液を透過させた。透過液中の銅イオンを原子吸光光度法により定量した。洗浄液として純水、溶出液として、0.1M塩酸を用いた。

4-3 結果と考察

1) スルホン酸基を有する膜の物性

SP、SSおよびSSS膜の物性をTable 4-1にまとめた。SSS/HEMAの共グラフト重合によって合成されたSSS膜の純水透過流束はほとんどゼロであった。これに対しSP膜およびSS膜の場合は、GMAグラフト鎖中のエポキシ基をスルホン酸基に変換するときの反応時間を制御し、スルホン酸基密度を抑えることによって膜の透過流束を維持することができる。このとき、SP膜の場合は0.08~0.84mol/kg-product、SS膜の場合は0.14~0.77mol/kg-productの範囲でスルホン酸基密度を変えられる。また、SP膜におけるスルホン酸基密度0.84mol/kgは、0.36mol/L-wet volumeに相当し、これは市販のカチオン交換ビーズ (TSKgel SP-Toyopearl 550, Tosoh Co.)

のスルホン酸基密度0.16mol/Lと同等な値である。

2) SP膜によるリゾチームおよび銅イオンの吸着

Fig. 4-3(a)は、SP膜に流量を変えてリゾチーム溶液を透過させたときに得られた破過曲線と溶出曲線である。横軸は無次元化した透過液量 (DEV) である。ここでDEVは、透過液量 (V_*) を膜体積 (V_m) で割った値である。

$$DEV = V_*/V_m \quad [-] \quad (4-3)$$

縦軸は、供給液中のタンパク質濃度 (C_0) に対する透過液中のタンパク質濃度 (C) の比である。また、以下の式を用いることによって、流量 (F) を膜内滞留時間 (t_r) に変換することができる。

$$t_r = \varepsilon \pi L (d_0^2 - d_1^2) / (4F) \quad [s] \quad (4-4)$$

ここで ε は膜の空孔率であり、含水率の測定により、SP膜の場合は $\varepsilon = 0.62$ であった。(4-4)式より、流量 $F = 10 \sim 100 \text{ mL/h}$ は、滞留時間 $t_r = 87 \sim 8.7 \text{ sec}$ に相当する。この範囲の滞留時間では破過曲線も溶出曲線も流量によらず一致した。これは、総括のイオン交換速度が拡散過程にもイオン交換反応過程にも支配されないことを示している。また、膜に吸着したリゾチームは、溶出液を3DEV透過させることによってほぼ100%溶出できた。

一方、SP膜に透過圧力を変えて銅イオン溶液を透過させた場合も、滞留時間0.61~24secの範囲で破過曲線が一致した (Fig. 4-3(b))。

Fig. 4-4は、SP膜にリゾチームおよび銅イオン溶液を透過させたときの破過曲線である。ここでは、SP膜のスルホン酸基密度を0.21~0.84mol/kgの範囲で変化させた。リゾチームを吸着させた場合、スルホン酸基密度によらず破過曲線は一致した。一方、銅イオンを吸着させた場合、スルホン酸基密度の増加とともに破過点 ($C/C_0 = 0.05$ となるDEV) が伸びた。得られた破過曲線を積分することによって、リゾチームおよび銅イオンの吸着容量 (q) を求めた。

$$q = \int_0^{V/V_0} (C_0 - C) dV / W_2 \quad [g/kg] \quad (4-5)$$

ここで、 C および C_0 はそれぞれ供給液および透過液中の濃度、 V は透過液量、 V_0 は C が C_0 に達したときの透過液量である。SP膜におけるスルホン酸基密度とリゾチームおよび銅イオン吸着容量との関係をFig. 4-5に示す。リゾチーム吸着容量はこの範囲のスルホン酸基密度では、一定の値であった。これに対し、銅イオンの吸着

容量はスルホン酸基密度にほぼ比例した。

放射線グラフト重合法によってグラフト鎖が形成する部位は、膜のアモルファス相内部と細孔表面部である。銅イオンは2価の陽イオンであること、およびSP膜のスルホン酸基密度と銅イオン吸着量のモル比が、 $d_{s,s}:q = 2:1$ に近いことから、グラフト鎖の形成部位に関係なくすべてのスルホン酸基が銅イオンの吸着に使われることがわかる。一方、銅イオンに比べてサイズの大きいリゾチームは、アモルファス相内部に侵入できないため、細孔表面部にあるグラフト鎖中のスルホン酸基のみがリゾチームの吸着に関与している (Fig. 4-6)。

3) SP膜およびSS膜のリゾチーム吸着性能の比較

Fig. 4-7は、SP膜およびSS膜にリゾチーム溶液を透過させたときの破過曲線および溶出曲線を比較したものである。ここでは、SP膜のスルホン酸基密度を0.08~0.84mol/kgの範囲で、SS膜のスルホン酸基密度を0.14~0.77mol/kgの範囲で変化させた。SP膜の破過曲線および溶出曲線がスルホン酸基密度によらず一致しているのに対し、SS膜の破過曲線は、スルホン酸基密度の増加とともに破過点が伸び、吸着終了までのDEVが増大することがわかった。また、SS膜の溶出曲線はスルホン酸基密度の増加とともにピーク高さ、半値幅ともに増大することがわかった。

Fig. 4-8にSP膜およびSS膜におけるスルホン酸基密度とリゾチーム吸着容量との関係を示す。SP膜の場合、スルホン酸基密度が0.2mol/kgを越えると、吸着容量は頭打ちになった。それに対しSS膜の場合、スルホン酸基密度の増加とともに吸着容量は直線的に増大した。

膜の細孔表面にリゾチームがend-on結合で単層吸着すると仮定したときの吸着容量 (q_1) を計算した。この値は次式で計算される。

$$q_1 = a \cdot M_r / (a N_A) \quad [g/kg] \quad (4-6)$$

M_r はリゾチームの分子量 (14,300)、 N_A はアボガドロ数である。また、 a は楕円球の形をしたリゾチーム分子 ($3.0 \times 3.0 \times 4.5 \text{ nm}$) の長軸に対して垂直に切ったときの断面積 $9 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ である (Blake et al., 1965)。SP膜の場合は $q_1 = 17.3 \text{ g/kg}$ 、SS膜の場合は $q_1 = 18.0 \text{ g/kg}$ と算出される。SP膜の q_1 を Fig. 4-8中に点線で示した。これより、リゾチームはSP膜には単層吸着するが、SS膜には多層吸着することがわかる。スルホン酸基密度0.77mol/kgを有するSS膜のリゾチーム吸着容量は200

g/kgであり、単層吸着量 q_1 の11倍である。SP膜とSS膜は同一グラフト率のGMA膜、すなわち同じグラフト鎖長およびグラフト鎖密度をもつGMA膜から合成している。しかしながら、異なる試薬でGMAグラフト鎖中のエポキシ基をスルホン酸基に変換したことによって、リゾチームの吸着形態に大きな差が生じた。以上の結果から、SP膜およびSS膜のグラフト鎖にリゾチームが吸着する形態を推察し、Fig. 4-9に示す。SP膜の場合、リゾチームはグラフト鎖上に乗るように吸着する。これに対し、SS膜の場合、リゾチームはグラフト鎖の間にもぐりこむように吸着する。

Kim et al. (1991a) は、放射線グラフト重合法を用いて、ポリエチレン製精密濾過膜にアフィニティーリガンドを有するグラフト鎖を導入した。この膜に牛血清 γ -グロブリン (BGG) をパッチ法で選択的に吸着させた場合、その吸着容量は比表面積によって決まり、BGGがarm-collapsed型とarm-extended型という二つの構造をとったときの理論吸着量の間値になった。

Muller (1990) は、化学的グラフト重合法を用いて、親水性ポリマービーズにスルホン酸基を有するグラフト鎖を導入した。このイオン交換体のタンパク質吸着容量は、担体の比表面積に依存しないことを見いだした。この現象について彼は、イオン交換基をもつ非架橋高分子鎖が、タンパク質に触毛 (Tentacle) のようにからみついて吸着するためであると考察し、この新しいイオン交換体をテントクル型イオン交換体と名付けた。本研究で合成したSS膜もこのテントクル型イオン交換体のひとつである。

4) 膜の親水化による非選択的吸着の抑制

本研究で使用した高分子基材はポリエチレン製である。ポリエチレン表面は疎水性であり、タンパク質が接触すると非選択的な吸着が起きる。ここでいう非選択的吸着とは溶出液によっても溶出できない吸着のことである。この非選択的吸着を防ぐために、基材に水酸基を導入し、親水化するという手法が有効である (Okano & Kataoka, 1982; Kim et al., 1991b)。本研究においては、まずSSS膜の合成の場合、スルホン酸基を有するモノマーであるSSSと水酸基を有するモノマーであるHEMAをポリエチレン基材に共グラフト重合させることによってスルホン化と親水化を同時におこなっている。また、SP膜およびSS膜を合成する過程では、GMAグラフト重合膜のスルホン化前あるいは後にジオール基を導入している。この

とき、膜の親水化が十分おこなわれていることを確認するために、GMAグラフト重合膜のエポキシ基をすべてジオール基に変換したジオール膜のリゾチーム吸着特性を調べ、基材の場合と比較した。基材およびジオール膜にリゾチーム溶液を透過させたときの破過曲線および溶出曲線をFig. 4-10に示す。基材の場合、吸着したリゾチームは溶出液の透過によっても溶出できないので、このリゾチームは非選択的に吸着している。一方、ジオール膜の場合、吸着したリゾチームは溶出液によって100%溶出できた。これより、膜の細孔表面がジオール基をもったグラフト鎖で覆われることによって、タンパク質の非選択的吸着が抑制されたことが確認された。

4-4 結言

放射線グラフト重合法を用いて、ポリエチレン製精密濾過膜に3通りの方法でスルホン酸基を導入した。得られた膜にリゾチームを含む溶液を透過させ、リゾチーム吸着速度および吸着容量を測定した。また、銅イオンを含む溶液を透過させたときの吸着特性も調べ、リゾチームの場合と比較した。つぎの知見が得られた。

(1) SSS/HEMAの共グラフト重合によって合成されたSSS膜の純水透過流束はほとんどゼロであった。一方、SP膜やSS膜の場合は、GMAグラフト鎖中のエポキシ基からスルホン酸基への転化率を制御することによって膜の透過流束を維持できた。

(2) SP膜の銅イオン吸着容量はスルホン酸基密度にほぼ比例したが、リゾチーム吸着容量はスルホン酸基密度に依存せず、一定の値であった。高分子量のタンパク質は、膜のアモルファス相内部に侵入できないため、細孔表面部にあるグラフト鎖にのみ吸着する。

(3) SP膜の場合、リゾチームはグラフト鎖上に乗るように単層で吸着するので、吸着容量は膜の比表面積で決まる。これに対しSS膜の場合、リゾチームはグラフト

ト鎖の間にもぐりこむように吸着し、スルホン酸基密度の増加とともに吸着容量も増大する。

(4) SP膜およびSS膜の合成時にジオール基を導入することによって、膜へのタンパク質の非選択的吸着が抑制された。選択的に吸着したリゾチームを溶出液によって100%溶出させることができた。

使用記号

a	リゾチーム分子の断面積 [m ²]
a _v	膜の比表面積 [m ² /kg]
C	透過液中のリゾチームあるいは銅イオン濃度 [g/m ³]
C ₀	供給液中のリゾチームあるいは銅イオン濃度 [g/m ³]
d _i	膜の内径 [m]
d _o	膜の外径 [m]
d _{SP}	SP膜のスルホン酸基密度 [mol/kg]
d _{SS}	SS膜のスルホン酸基密度 [mol/kg]
d _{SSS}	SSS膜のスルホン酸基密度 [mol/kg]
dg	GMAグラフト率 [%]
DEV	無次元化した透過液量 [-]
F	体積流量 [m ³ /s]
L	膜の長さ [m]
M _r	リゾチームの分子量 [-]
N _A	アボガドロ数 [-]
q	吸着容量 [g/kg]
q ₁	単層吸着量 [g/kg]
t _r	液の膜内滞留時間 [s]
V ₁	透過液量 [m ³]
V _m	膜体積 [m ³]

V_1 Cが C_0 に達したときの透過液量 [m³]

V_0 基材の重量 [kg]

\bar{W}_1 GMAグラフト重合膜の重量 [kg]

\bar{W}_2 スルホン酸基導入後の膜の重量 [kg]

ϵ 膜の空隙率 [-]

引用文献 (第4章)

Azanova, V. V.; Hradil, J.; Svec, F.; Pelzbauer, Z.; Panarin, E. F.
"Reactive Polymers. 60. Glycidylmethacrylate-Styrene-Ethylenedimethacrylate Terpolymers Modified with Strong-Acid Groups."
React. Polym. 12, 247 (1990).

Blake, C. C. F.; Koenig, D. F.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips, G. A.; Sarma, V. R. "Structure of Hen Egg-White Lysozyme."
Nature 206, 757 (1965).

Hrudkova, H.; Svec, F.; Kalal, J. "Reactive Polymers XIV. Hydrolysis of the Epoxide Groups of the Copolymer Glycidylmethacrylate-Ethylenedimethacrylate." Br. Polym. J. 9, 238 (1977).

Kim, M.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I. "Adsorption and Elution of Bovine Gamma-Globulin Using an Affinity Membrane Containing Hydrophobic Amino Acids as Ligands." J. Chromatogr. 585, 27 (1991a).

Kim, M.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Water Flux and Protein Adsorption of a Hollow Fiber Modified with Hydroxyl Groups." J. Membr. Sci. 56, 289 (1991b).

Konishi, S.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T. "Sorption Kinetics of Cobalt in Chelating Porous Membrane." Ind. Eng. Chem. Res. 31, 2722 (1992).

Muller, W. "New Ion Exchangers for the Chromatography of Biopolymers." J. Chromatogr. 510, 133 (1990).

Okano, T.; Kataoka, K. "Biomaterial Science." 化学の領域, 増刊135号,
57 (1982).

Ribeiro, C. M. A.; Hradil, J.; Svec, F.; Kalal, J. "Reactive Polymers
XXVIII. Modification of Hydrolyzed Glycidylmethacrylate-Ethylenedime-
thacrylate Copolymers by Propane Sultone."
Angew. Makromol. Chem. 87, 119 (1980).

Saito, K.; Hori, T.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Porous
Amidoxime-Group-Containing Membrane for the Recovery of Uranium from
Seawater." Ind. Eng. Chem. Res. 26, 1977 (1987).

Tsuneda, S.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Metal
Collection Using Chelating Hollow Fiber Membrane." J. Membr. Sci.
58, 221 (1991).

Yamagishi, H.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I.
"Introduction of a High-Density Chelating Group into a Porous Membrane
without Lowering the Flux." Ind. Eng. Chem. Res. 30, 2234 (1991).

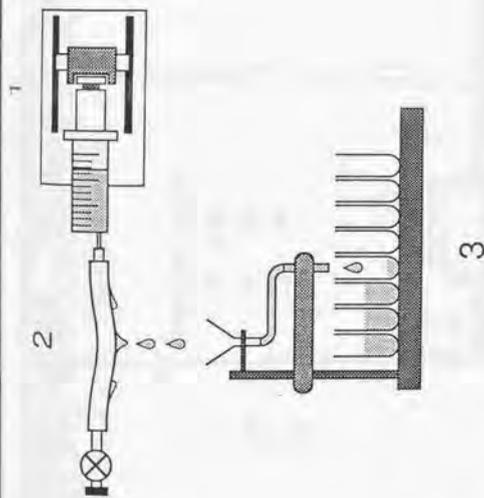
Table 4-1. Properties of the Microporous Membranes Containing the SO₃H Group

	SSS-T	SP-T	SS-T	starting hollow fiber
degree of grafting (%)	110	150	150	-
dimensions in wet state				
inner diam (mm)	2.4	2.3	2.3	1.95
outer diam (mm)	4.0	3.9	3.9	3.01
total ion-exchange capacity (mol/kg ^a)	1.01	0.21	0.14	-
pure water flux ^b (m/h)	0.0	2.7	2.2	2.85
specific surface area ^c (m ² /g)	6.8	6.9	7.2	14.0

^a Kg of H-form membrane.

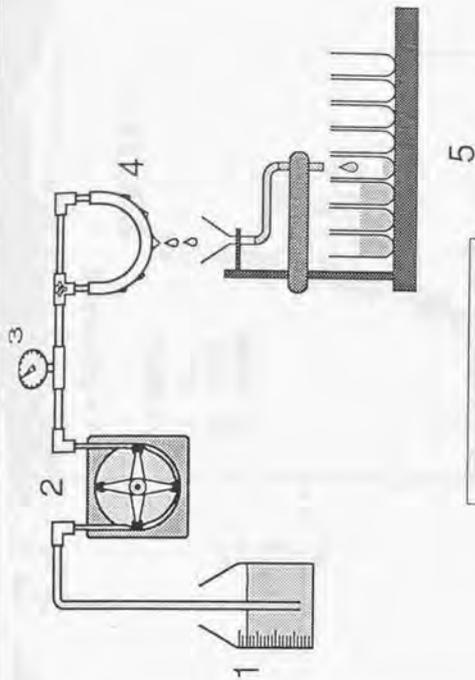
^b Filtration pressure = 0.1 MPa, temp. = 303K.

^c BET surface area.



1. Syringe infusion pump
2. Hollow fiber;
3. Fraction collector

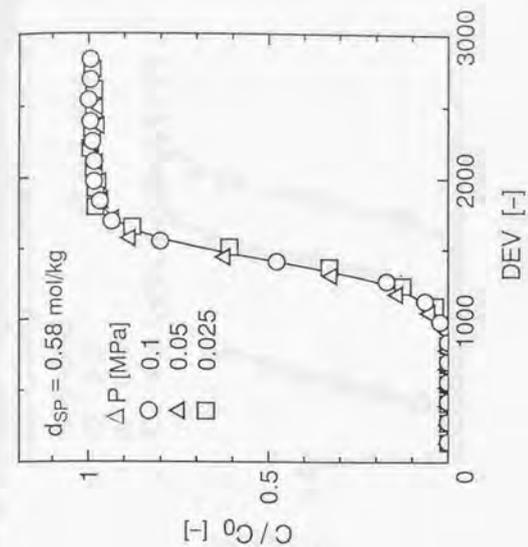
(a)



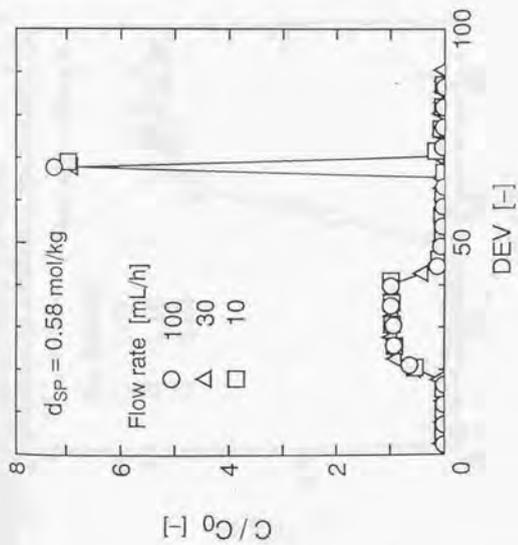
1. Feed tank
2. Flow controller
3. Pressure gauge
4. Hollow fiber
5. Fraction collector

(b)

Fig. 4-2. Experimental apparatus for determination of the breakthrough curve across the sulfonic-acid-group-containing membrane.
(a) Lysozyme; (b) Copper ion.

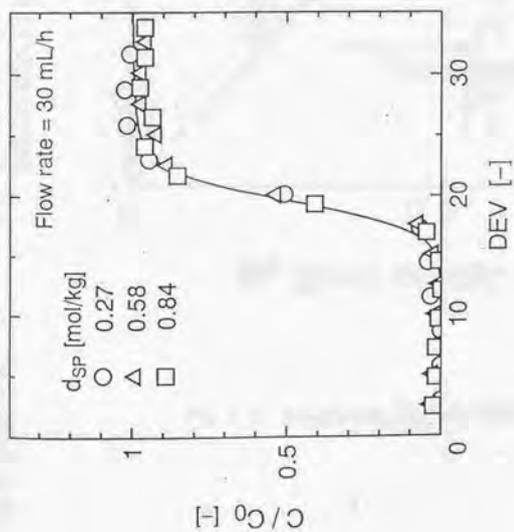


(a)

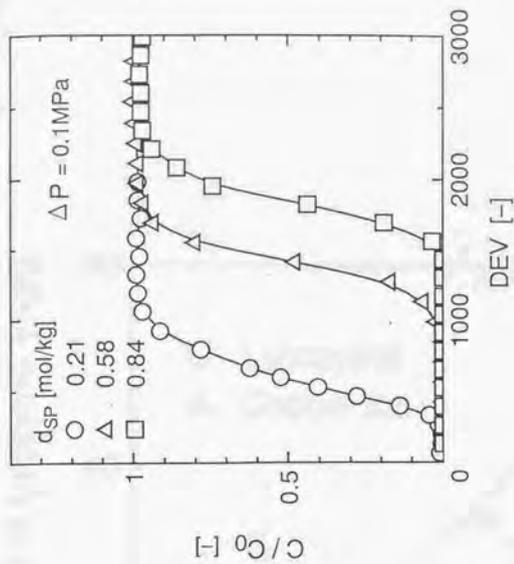


(b)

Fig. 4-3. Breakthrough and elution curves for different residence times.
 (a) lysozyme, (b) copper ion



(a)



(b)

Fig. 4-4. Breakthrough curves for different SP group densities.
 (a) lysozyme, (b) copper ion

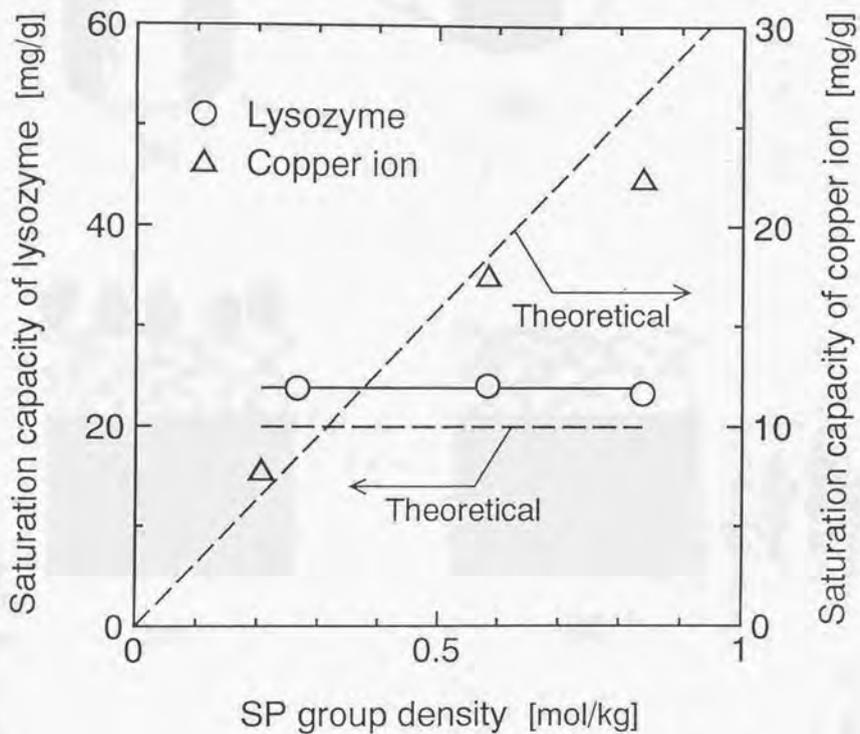


Fig. 4-5. Equilibrium capacity vs SP group density.

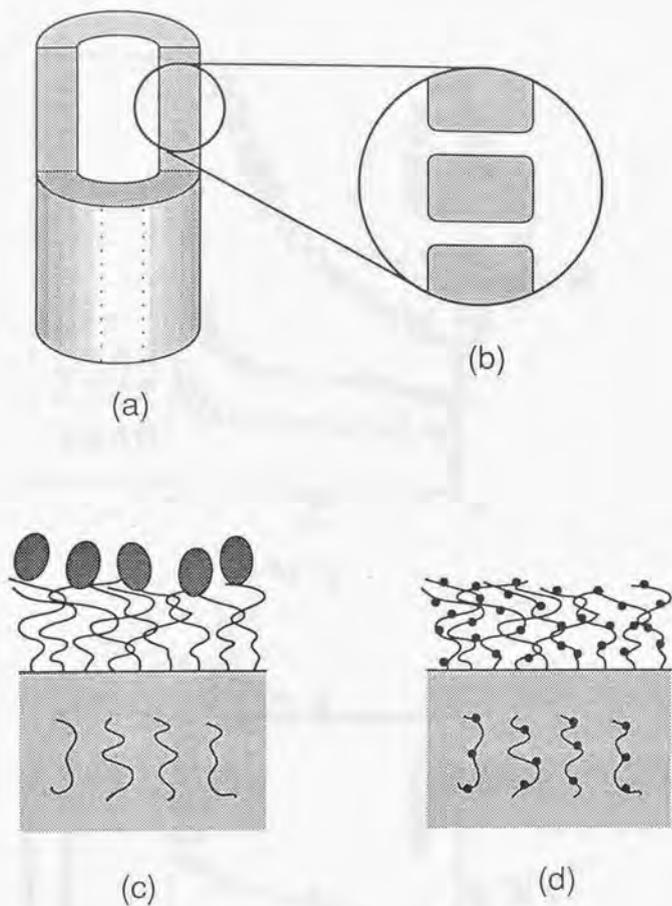


Fig. 4-6. Schematic illustration of ion exchange on the grafted polymer branches. (a) Porous hollow fiber, (b) idealized porous structure, (c) adsorption of lysozyme: Biomacromolecular lysozyme can only access the SP groups of polymer branches grafted on the pore surface. (d) sorption of Cu ion: A simple copper ion can also invade the depths of the polymer branches formed in the polymer matrix.

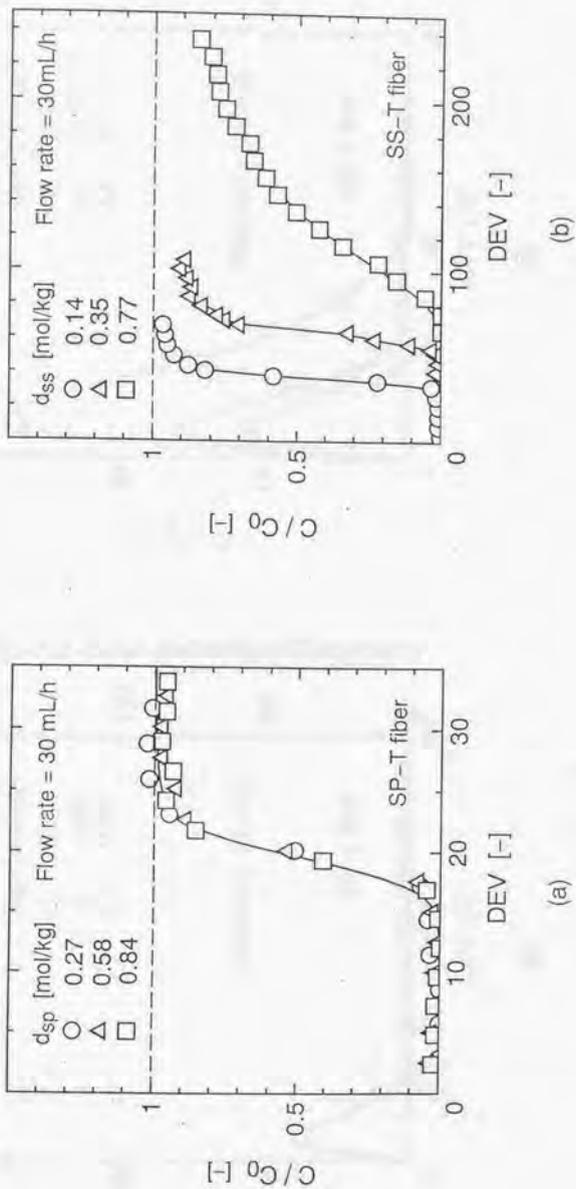


Fig. 4-7. Breakthrough and elution curves of lysozyme across the microporous cation-exchange membrane. (a) Breakthrough curves of SP-T fiber; (b) Breakthrough curves of SS-T fiber; (c) Elution curves of SP-T fiber; (d) Elution curves of SS-T fiber
 d_{sp} , d_{ss} = total density of the SO_3H group

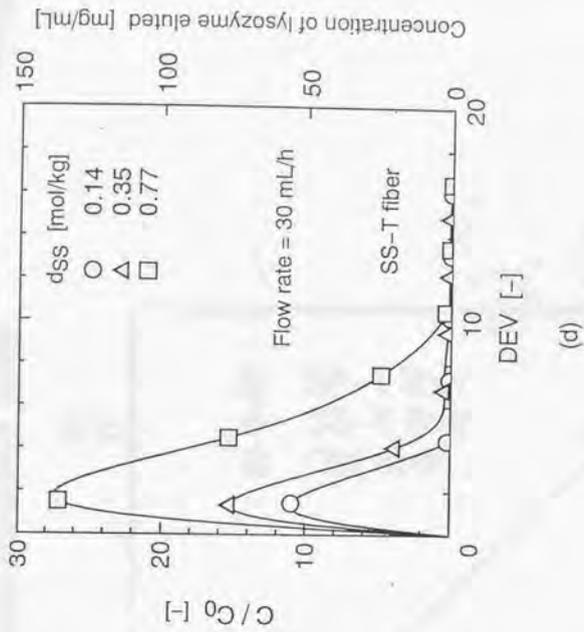
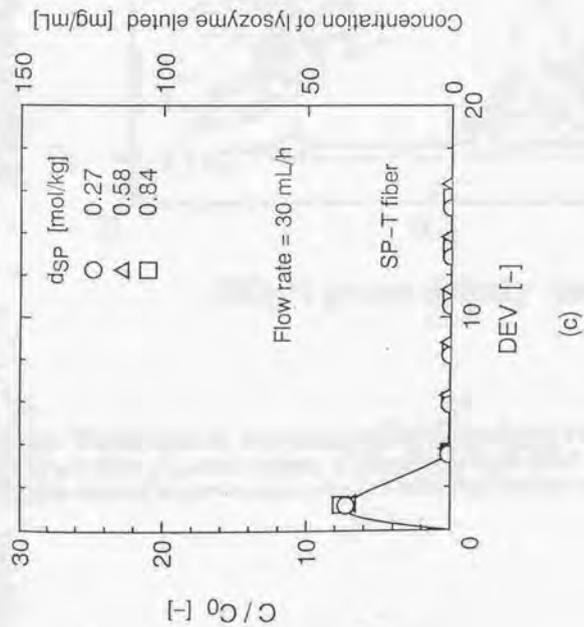


Fig. 4-7. Breakthrough and elution curves of lysozyme across the microporous cation-exchange membrane. (a) Breakthrough curves of SP-T fiber; (b) Breakthrough curves of SS-T fiber; (c) Elution curves of SP-T fiber; (d) Elution curves of SS-T fiber
 d_{SP} , d_{SS} = total density of the SO_3H group

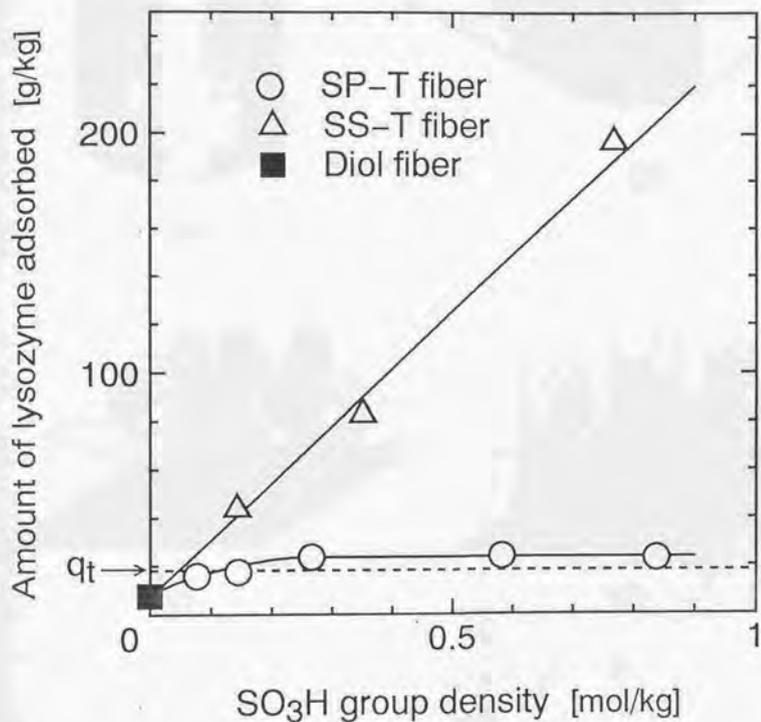


Fig. 4-8. Binding capacity of lysozyme to the SO₃H group on the grafted polymer branches. q_t is a theoretical saturation capacity of lysozyme onto the SP-T fiber on the assumption that lysozyme covers the pore surface area as a monolayer with an end-on orientation.

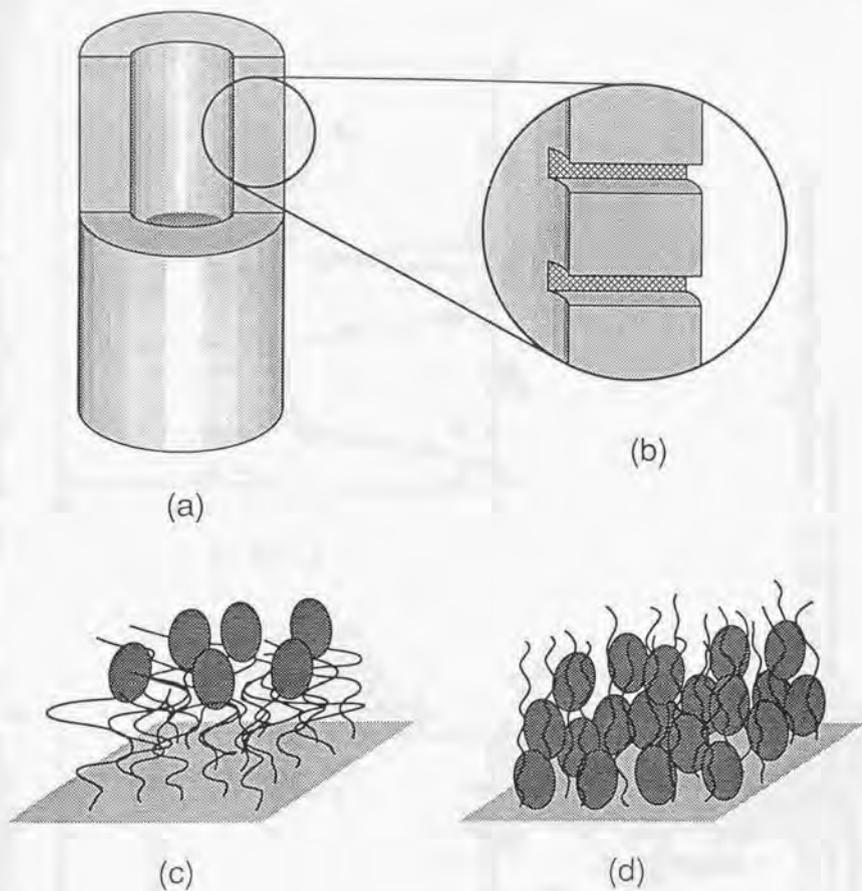


Fig. 4-9. Schematic illustration of lysozyme binding to the grafted branches.
 (a) porous hollow fiber, (b) idealized porous structure, (c) lysozyme binding to the SP group: The lysozyme adheres on the SP-group-containing grafted branches.
 (d) lysozyme binding to the SS group: The SS-group-containing grafted branches hold the lysozyme.

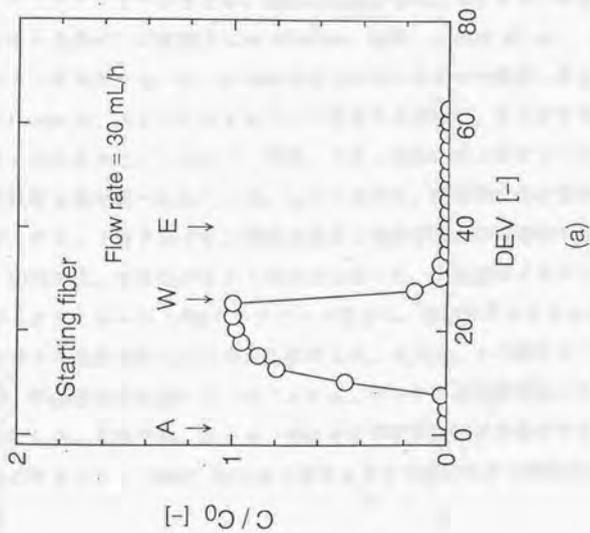
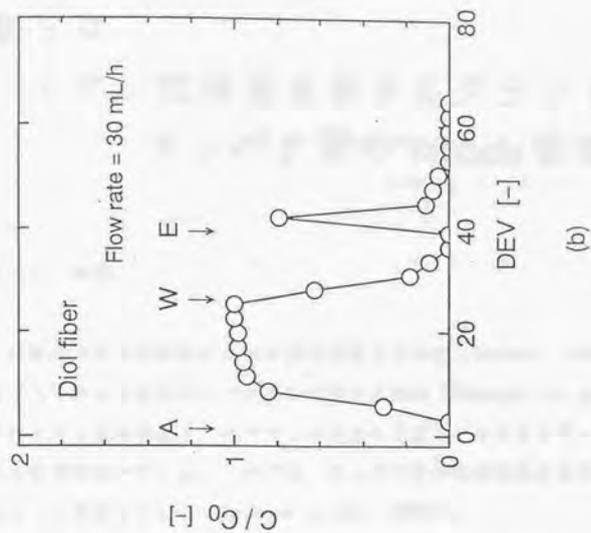


Fig. 4-10. Breakthrough and elution curves of lysozyme across the starting and diol-group-containing hollow fibers. (a) Starting hollow fiber; (b) Diol-group-containing hollow fiber
A = adsorption; W = washing; E = elution

第5章

イオン交換基を有するグラフト鎖への タンパク質の Tentacle 吸着

5-1 緒言

培養液中から有用なタンパク質を回収する場合 (Hochuli, 1988)、あるいは血しょう中から有害なタンパク質を除去する場合 (Yamazaki et al., 1987)、現状ではイオン交換基あるいはアフィニティリガンドを有するビーズを充填したカラムが利用されている。このとき、タンパク質の吸着容量は吸着担体の比表面積によって決まっている (Reynaud et al., 1986)。

MERCK社では、化学的グラフト重合法を用いて、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸 ($\text{CH}_2=\text{CHCONHC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, AMPS) およびジエチルアミノエチルアクリルアミド ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, DEAEAAm) を親水性のポリマービーズにグラフト重合し、担体の比表面積によらずタンパク質が多層吸着するイオン交換ビーズを開発した (Muller, 1990; Janzen et al., 1990)。これは、イオン交換基をもつ互いに架橋されていないポリマー鎖が、タンパク質に触毛 (Tentacle) のようにならみついて吸着するため、テントクル型イオン交換体と名付けられた。これまで、担体、イオン交換基およびタンパク質の種類を変えて吸着容量が調べられている。しかしながら、単層吸着量に対する吸着容量の比や、グラフト鎖中のイオン交換基密度と吸着容量との関係は明らかにされていない。

前章では、放射線グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン膜にグリシジルメタクリレート (GMA) をグラフト重合し、亜硫酸ナトリウムとの反応により、スルホン酸基を導入する手法を提案した。そして、この膜のリゾチーム吸着容量が、単層吸着量を越えていることから、テントクル吸着を起こしていることを見いだした。本章では、スルホン酸基を有するテントクル型カチオン交換膜およびジエチルアミノ (DEA) 基を有するテントクル型アニオン交換膜の合成法をまず確

立する。そして、この膜にタンパク質溶液を透過させたときの吸着性能を調べ、テンタクル吸着の発現特性について考察する。本章の目的は次の3点である。

- (1) グラフト鎖中のイオン交換基密度を変化させたときの膜の吸着破過特性を調べ、テンタクル吸着を起こすタンパク質の量を比較する。
- (2) 膜の透過圧力変化を測定し、その流動特性からタンパク質のグラフト鎖へのテンタクル吸着を確認する。
- (3) タンパク質のサイズや性質を変えたとき吸着量を調べ、テンタクル吸着の一般性を調べる。

1) 基材と試薬

市販のポリエチレン製中空糸状精密濾過膜（旭化成工業（株）製）を基材に用いた。この膜の物性は、内径1.95mm、外径3.01mm、公称孔径0.34 μ mおよび空孔率71%である。試薬には、グリシジルメタクリレート（ $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CHOCH}_2$ 、GMA）、特級亜硫酸ナトリウム（ Na_2SO_3 、SS）、ジエチルアミン（ $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ）およびエタノールアミン（ $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ）を用いた。タンパク質は、ラクトグロブリン（Sigma; Cat.No.L-0130）、牛血清アルブミン（Sigma; Cat.No.L-7030）、牛血清 γ -グロブリン（Sigma; Cat.No.G-5009）、キモトリプシノーゲンA（Sigma; Cat.No.C-4879）、チトクロームC（Sigma; Cat.No.C-2506）およびリゾチーム（和光純薬工業（株）; Cat.No.126-02671）を用いた。

2) テンタクル型イオン交換膜の合成法

a) 放射線グラフト重合

テンタクル型イオン交換膜の合成経路をFig.5-1に示す。10cmの中空糸膜に常温、窒素雰囲気下で電子線を200kGy照射した。照射した中空糸膜をあらかじめ脱気しておいた10v/v%のGMA/メタノール溶液に投入し、40°Cでグラフト重合反応をおこなった。GMAグラフト重合反応の詳細は、第3章に記述した。基材に導入したGMAのグラフト重合量をグラフト率で定義した。

$$\text{GMAグラフト率 (dg)} = 100[(W_1 - W_0)/W_0] \quad [\%] \quad (5-1)$$

ここで、 W_0 と W_1 はそれぞれ基材およびGMAグラフト重合膜の重量である。本研究では、グラフト重合反応を10~12分間おこなうことにより、GMAグラフト率を150~200%に調節した。

b) テンタクル型カチオン交換膜の合成

GMAグラフト重合膜を亜硫酸ナトリウム（SS）とイソプロパノール（IPA）の混合水溶液（SS/IPA/ H_2O = 10/15/75）に投入し、80°Cで所定時間反応をおこない、グラフト鎖中のエポキシ基をスルホン酸基（ $-\text{SO}_3\text{H}$ ）に変換した。反応後、膜を純水で数回洗浄し、真空乾燥して重量を測定した。導入されたスルホン酸基の基材重量あたりの密度（ d_{s3} ）は膜の中性塩分解容量を測定することによって求めた。

つぎに、この膜を0.5Mの硫酸中に投入し、80℃で2時間反応をおこない、グラフト鎖中に残存していたエポキシ基をジオール(Diol)基に変換した(Hrudkova et al., 1977)。これによって膜が親水化され、タンパク質の非選択的吸着を防ぐことができる(Kim et al., 1991a)。反応後、膜を純水で数回洗浄し、真空乾燥して重量を測定した。導入されたDiol基の基材重量あたりの密度は以下の式より求めた。

$$\text{Diol基密度}(d_{\text{Diol}}) = (W_3 - W_2) / 18 / W_0 \quad [\text{mol/kg}] \quad (5-2)$$

ここで、 W_2 はスルホン酸基導入後の膜の重量、 W_3 はDiol基導入後の膜の重量、また18という数字は、水の分子量を表す。

こうして得られた膜を以後、SS(m_{SS})-Diol膜とよぶことにする。()内の数値は次式で定義されるスルホン酸基のモル分率を表す。

$$\text{スルホン酸基モル分率}(m_{\text{SS}}) = d_{\text{SS}} / (d_{\text{SS}} + d_{\text{Diol}}) \quad [-] \quad (5-3)$$

c) テンタクル型アニオン交換膜の合成

GMAグラフト重合膜を50v/v%のジエチルアミン水溶液に投入し、30℃で所定時間反応をおこない、グラフト鎖中のエポキシ基をジエチルアミノ(DEA)基(-N(C₂H₅)₂)に変換した。反応後、膜を純水で数回洗浄し、真空乾燥して重量を測定した。導入されたジエチルアミノ(DEA)基の基材重量あたりの密度は次式より求めた。

$$\text{DEA基密度}(d_{\text{DEA}}) = (W_2 - W_1) / 73 / W_0 \quad [\text{mol/kg}] \quad (5-4)$$

ここで、 W_2 はDEA基を有する膜の重量、また73という数字は、ジエチルアミンの分子量である。

次に、DEA基導入後の膜を100%エタノールアミン中に投入し、30℃で6時間反応をおこない、グラフト鎖中に残存していたエポキシ基をエタノールアミノ(EA)基(-NCH₂CH₂OH)に変換した(Pharmacia LKB Biotech., 1990)。アルコール性水酸基が導入されることによって膜が親水化され、タンパク質の非選択的吸着を防ぐことができる。反応後、膜を純水で数回洗浄し、真空乾燥して重量を測定した。導入されたエタノールアミノ(EA)基の基材重量あたりの密度は次式より求めた。

$$\text{EA基密度}(d_{\text{EA}}) = (W_3 - W_2) / 61 / W_0 \quad [\text{mol/kg}] \quad (5-5)$$

ここで、 W_3 はEA基導入後の膜の重量、また61という数字は、エタノールアミンの

分子量である。

こうして得られた膜を以後、DEA(m_{DEA})-EA膜とよぶことにする。()内の数値は次式で定義されるDEA基のモル分率を表す。

$$\text{DEA基モル分率} (m_{DEA}) = d_{DEA} / (d_{DEA} + d_{EA}) \quad [-] \quad (5-6)$$

3) テンタクル型イオン交換膜の物性

乾燥したSS-Diol膜およびDEA-EA膜をメタノールに10分間浸し、続いて純水置換して膜細孔内を水で満たした。そのときの内径(d_i)および外径(d_o)を顕微鏡で、長さ(L)を定規で、さらに湿润重量(W_w)を天秤で測定した。これらの測定値を用いて、膜体積(V_m)および細孔容積(V_p)を求めた。

$$V_m = \pi L(d_o^2 - d_i^2) / 4 \quad [\text{m}^3] \quad (5-7)$$

$$V_p = (W_w - W_d) / \rho_w \quad [\text{m}^3] \quad (5-8)$$

ただし ρ_w は25°Cにおける水の密度である。

また、SS-Diol膜およびDEA-EA膜にバッファーを透過させたときの透過流束を測定した。測定法については第3章に記述した。

さらに、SS-Diol膜およびDEA-EA膜を真空乾燥後、比表面積計(Quantasorb, Yuasa Ionics Co.)を用いて、窒素吸着法により、膜の比表面積(a_s)を測定した。

4) 透過法によるタンパク質の吸着実験

Fig. 5-2に示すような装置を用いて、SS-Diol膜およびDEA-EA膜にタンパク質を含む溶液を透過させ、タンパク質の吸着実験をおこなった。室温で、輸注ポンプ(ATOM-235, ATOM Co.)を用いて一定流量で、膜にタンパク質溶液を透過させた。吸着実験の供給液として用いたタンパク質溶液の調製条件をTable 5-1にまとめた。長さ約13cmの中空糸膜をI字状にセットし、輸注ポンプの圧力で膜内面から外面にタンパク質溶液を一定流量で透過させた。膜外面から透過してきた液をフラクションコレクターによって分取し、各フラクションのタンパク質濃度を280nmの吸光度を測定して求めた。また、タンパク質吸着にともなう透過圧力の変化も圧力センサー(PS-2KS, Aiko Engineering Co.)により同時に測定した。透過液中のタンパク質濃度が供給液中の濃度と等しくなったことを確認した後、膜にバッフ

ァーを10mL透過させ、膜細孔内の洗浄をおこなった。

5-3 結果と考察

1) SS-Diol膜およびDEA-EA膜の合成

イオン交換基の導入反応、すなわちエポキシ基からスルホン酸基への変換反応あるいはエポキシ基からジエチルアミノ (DEA) 基への変換反応におけるイオン交換基導入量の経時変化をFig.5-3に示す。ただし、ここでは水酸基導入後の膜のスルホン酸基およびDEA基モル分率をそれぞれ算出し、これを縦軸とした。反応時間を制御して、スルホン酸基モル分率は0~0.20の範囲で、またDEA基モル分率は0~0.89の範囲で変えることができる。

2) SS-Diol膜およびDEA-EA膜の物性

イオン交換基モル分率の異なるSS-Diol膜およびDEA-EA膜にバッファーを透過させたときの透過流束をFig.5-4に示す。イオン交換基モル分率の増加とともに透過流束が低下していることがわかる。これは、水溶液中でイオン交換基が解離するため、細孔表面部のグラフト鎖が自身のもつ同種の電荷 (SS-Diol膜の場合は負電荷、DEA-EA膜の場合は正電荷) の反発作用によって伸長し、細孔をふさぐからである。細孔表面部にあるグラフト鎖のイオン交換基モル分率の増加にともないグラフト鎖の伸長度は増大し、膜の透過流束の低下を引き起こしたと考えられる (第3章)。特に、SS-Diol膜において透過流束の低下が著しい。

BET法による比表面積測定により、SS-Diol膜およびDEA-EA膜の比表面積 a_v はイオン交換基量に依存せずほとんど一定であることがわかった (Fig.5-5)。

3) SS-Diol膜およびDEA-EA膜によるタンパク質の吸着

Fig.5-6は、SS-Diol膜およびDEA-EA膜にリゾチーム溶液およびBSA溶液をそれぞれ透過させたときの破過曲線である。横軸は無次元化した透過液量 (DEV) である。ここでDEVは、次式のように透過液量 (V_s) を膜体積 (V_m) で割った値である。

$$DEV = V_s / V_m \quad [-] \quad (5-9)$$

縦軸は、供給液中のタンパク質濃度 (C_0) に対する透過液中のタンパク質濃度 (C) の比である。イオン交換基モル分率の増加とともに破過点 ($C/C_0 = 0.05$ となる DEV) が伸び、吸着終了までの DEV が增大することがわかった。

この破過曲線を積分することによって、タンパク質の吸着容量を求めた。

$$q = \int_0^{V_0} (C_0 - C) dV_0 / W_0 \quad [\text{g/kg}] \quad (5-10)$$

ここで、 q はタンパク質吸着量、 C および C_0 はそれぞれ供給液および透過液中のタンパク質濃度、 V_0 は透過液量、 V_0 は C が C_0 に達したときの透過液量である。

また、あらかじめそれぞれの膜の細孔表面にタンパク質が end-on 結合で単層吸着したときの吸着容量 (q_i) を計算した。この値は次式で計算される。

$$q_i = a \cdot M_r / (a N_A) \quad [\text{g/kg}] \quad (5-11)$$

M_r はタンパク質の分子量、 N_A はアボガドロ数である。 a はタンパク質分子の長軸に対して垂直に切ったときの断面積で、

$$a = \pi z^2 / 4 \quad [\text{m}^2] \quad (5-12)$$

である。ただし、 z はタンパク質分子の短軸直径である。(5-11)、(5-12) 式より、SS-Diol 膜にリゾチームが単層吸着した場合は $q_i = 18 \text{g/kg}$ 、DEA-EA 膜に BSA が単層吸着した場合は $q_i = 45 \text{g/kg}$ と算出された。

つぎに、透過実験によって得られたタンパク質の吸着容量の単層吸着量に対する比を 'テンタクル結合度' と定義した。

$$\text{テンタクル結合度} = q/q_i \quad [-] \quad (5-13)$$

Fig. 5-7 にイオン交換基モル分率とテンタクル結合度との関係を示す。イオン交換基モル分率の増加とともにタンパク質のテンタクル結合度は増大した。スルホン酸基モル分率 0.20 を有する SS-Diol 膜のリゾチーム吸着容量が 200g/kg 、DEA 基モル分率 0.89 を有する DEA-EA 膜の BSA 吸着容量が 490g/kg であり、いずれもテンタクル結合度が 10 を越える値であることがわかった。

4) 圧力損失によるテンタクル吸着の検証

DEA-EA 膜に一定流量で BSA 溶液を透過させたときの透過圧力は、BSA の吸着が進むにつれて増大する。

楕円球の形をした BSA 分子がグラフト鎖に最密充填的に吸着していると仮定すると、BSA の全占有体積 V_0 は、

$$V_B = qW_B \pi (z^2 h / 6) N_A / (M_B \times 0.74) \quad [\text{m}^3] \quad (5-14)$$

ただし、 z および h はBSA分子を楕円球としたときの短軸および長軸直径、0.74という定数は楕円球が六方最密充填構造をとったときの充填率である。 N_A はアボガドロ数、 M_B はBSAの分子量である。一方、吸着したBSAの全占有体積が膜細孔容積の減少分と等しいと仮定すると、次式が成り立つ。

$$V_B = n\pi (r_0^2 - r^2) D_T \quad [\text{m}^3] \quad (5-15)$$

ここで、 n は全細孔数、 r_0 はBSA吸着前の膜細孔半径、 r はBSA吸着平衡時の膜細孔半径、 D_T は膜厚である。

BSAの吸着によって液の透過できる細孔径が減少したとすると、BSA吸着平衡時の膜の透過圧力を推算できる。Hagen-Poiseuille式によって、多孔性中空糸膜の透過圧力を次のように記述できる(第3章)。

$$\Delta P_0 = 8F\mu D_T / (n\pi r_0^4) \quad [\text{Pa}] \quad (5-16)$$

$$\Delta P = 8F\mu D_T / (n\pi r^4) \quad [\text{Pa}] \quad (5-17)$$

ただし、モデルを単純化するため、中空糸膜の細孔は、一定の半径を有するまっすぐな円筒が均一に分布していると仮定する。ここで、 ΔP_0 はDEA-EA膜にBSA溶液を透過させたときの初期の透過圧力、 ΔP はBSA吸着平衡時の透過圧力である。また、 F は体積流量、 μ はBSA溶液の粘度である。全細孔数、膜厚、透過液粘度および体積流量が一定あるとすれば、(5-15)、(5-16)、(5-17)式より、 $\Delta P / \Delta P_0$ は

$$\Delta P / \Delta P_0 = 1 / (1 - V_B / V_p)^2 \quad [-] \quad (5-18)$$

と表すことができる。ここで、 $V_p (= n\pi r_0^2 D_T)$ はBSA吸着前の膜の細孔容積であり、膜の含水量を測定することによって(5-8)式から求められる。また、破過曲線より求められたBSAの吸着容量(q)を(5-14)式に代入することによって、 V_B が求められる。よって、 $\Delta P / \Delta P_0$ を理論的に予測できる。

(5-18)式より得られた $\Delta P / \Delta P_0$ と実測した $\Delta P / \Delta P_0$ とを比較し、Fig. 5-8に示す。DEA基モル分率の異なるいずれの膜においても、実験値と理論値はよく一致している。これより、吸着容量から推測したBSAのDEA-EA膜へのテンタクル吸着構造の妥当性が、流体力学的側面からも裏付けられた。

吸着容量および透過圧力の実験結果より、イオン交換基を有するグラフト鎖にタンパク質が吸着するときの形態を推測し、Fig. 5-9に示す。イオン交換基モル分率の増加とともに、グラフト鎖中の電荷が互いに反発してグラフト鎖が伸長し、

タンパク質をより多く抱き込む形態をとると考えられる。

Kim et al. (1991b) は、多孔性ポリエチレン膜にGMAをグラフト重合し、グラフト鎖中のエポキシ基に疎水性アミノ酸（トリプトファンやフェニルアラニン）をカップリングさせた。得られた膜は、擬生物特異的リガンドをもつアフィニティ膜であり、牛血清γ-グロブリンなどのタンパク質を選択的に吸着する。しかしながら、この膜はグラフト鎖に電荷をもたないので、Fig. 5-9(a)のようにグラフト鎖が縮んだ形態をとり、タンパク質の吸着量は単層吸着量と一致した。

5) 各種タンパク質のテンタクル吸着

チトクロームC、リゾチームおよびキモトリプシノーゲンAをSS(0.20)-Diol膜に、BSA、BGGおよびラクトグロブリンをDEA(0.47)-EA膜に吸着させた。それぞれのタンパク質の性質 (Squire & Himmel 1979; Wahlgren et al., 1993; Baszkin & Lyman, 1980; Bagchi & Birnbaum, 1981)、および吸着容量をTable 5-2にまとめた。各タンパク質のサイズから単層吸着したときの吸着容量を求め、実測した吸着容量と比較した。SS-Diol膜およびDEA-EA膜はいずれのタンパク質に対しても単層吸着量の数倍の吸着容量を示し、テンタクル吸着を起こすことが確認された。

しかしながら、ここで基準にした単層吸着量は、タンパク質のサイズと膜の表面積から理論的に計算した値であり、もともと凝集しやすいタンパク質の場合、この単層吸着量の値を基準にしてテンタクル結合度を求め、膜の性能評価をおこなうことは無意味である。そこで、本研究で用いたすべてのタンパク質について、①ポリエチレン基材の疎水性表面への吸着量、および②水酸基をもつ膜 (Diol膜) の親水性表面への吸着量をそれぞれ透過法によって測定し、単層吸着量と比較することによってタンパク質の凝集しやすいの指標とした。結果をTable 5-3にまとめた。すべてのタンパク質において、1) 親水性表面への吸着量は疎水性表面への吸着量の1/5~1/3倍という低い値を示したこと、および2) 親水性表面へ吸着したタンパク質は洗浄液および塩濃度の高い溶出液を透過させることによって90%以上溶出することができたのに対し、疎水性表面へ吸着したタンパク質はほとんど溶出できないことがわかった。

この結果から、タンパク質の疎水性表面への吸着は不可逆的な非選択的吸着であり、親水性表面への吸着は可逆的な選択的吸着であることが確認された。また、

疎水性および親水性どちらの性質をもつ表面においても、キモトリプシノーゲン A を除いたすべてのタンパク質の吸着量が、end-onの形態で吸着したと考えた場合の単層吸着量以下の値を示した。キモトリプシノーゲン A についても疎水性表面への吸着量はend-on単層吸着量を上回る値(1.3倍)を示したが、親水性表面への吸着量はend-on単層吸着量以下であることから、SS-Diol膜に凝集した状態で吸着していることはないことが確認できた。

5-4 結言

放射線グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン製中空糸膜にグリシジルメタクリレート(GMA)を重合し、続くジエチルアミンとの反応でジエチルアミノ(DEA)基を、亜硫酸ナトリウムとの反応でスルホン酸基をそれぞれ導入した。この膜を親水化した後、タンパク質溶液を透過させ、その吸着性能を検討した。膜の細孔表面にタンパク質が単層吸着したときの吸着量を基準にして、テンタクル結合度を求め、以下のような結論を得た。

(1) グラフト鎖中のイオン交換基密度が大きいほどタンパク質のテンタクル結合度は増大した。スルホン酸基モル分率0.20を有するSS-Diol膜のリゾチーム吸着容量が200g/kg、DEA基モル分率0.89を有するDEA-EA膜のBSA吸着容量が490g/kgであり、いずれも単層吸着量の約11倍の吸着容量をもつことがわかった。

(2) BSAの吸着で細孔が埋められるために生じる膜の圧力損失をHagen-Poiseuille式を用いて推算し、実測値と比較した。その結果、BSAが膜の細孔壁からグラフト鎖に沿って最密充填的に吸着しているというモデルが妥当であることを確認した。

(3) SS-Diol膜およびDEA-EA膜は、タンパク質の種類や分子量によらず、テンタクル吸着を起こすことを確認した。

使用記号

a	タンパク質分子の断面積 [m^2]
a_v	膜の比表面積 [m^2/kg]
C	透過液のタンパク質濃度 [g/m^3]
C_0	供給液のタンパク質濃度 [g/m^3]
d_{DEA}	DEA基密度 [mol/kg]
d_{DIEI}	ジオール基密度 [mol/kg]
d_{EA}	EA基密度 [mol/kg]
d_i	膜の内径 [m]
d_o	膜の外径 [m]
d_{SS}	スルホン酸基密度 [mol/kg]
dg	GMAグラフト率 [%]
DEV	無次元化した透過液量 [-]
D_T	膜厚 [m]
F	体積流量 [m^3/s]
F_0	吸着前の体積流量 [m^3/s]
h	タンパク質分子の長軸 [m]
L	膜の長さ [m]
m_{DEA}	DEA基モル分率 [-]
m_{SS}	スルホン酸基モル分率 [-]
M_i	タンパク質の分子量 [-]
n	全細孔数 [-]
N_A	アボガドロ数 [-]
ΔP	タンパク質吸着平衡時の透過圧力 [Pa]
ΔP_0	タンパク質吸着前の透過圧力 [Pa]
q	吸着容量 [g/kg]
q_i	単層吸着量 [g/kg]
r	細孔半径 [m]
r_0	吸着前の細孔半径 [m]

- V_B 吸着したタンパク質の占有体積 [m^3/g]
- V 透過液量 [m^3]
- V_m 膜体積 [m^3]
- V_p 細孔容積 [m^3]
- V_s C が C_0 に達したときの透過液量 [m^3]
- W_0 基材の乾燥重量 [kg]
- W_1 GMAグラフト重合膜の乾燥重量 [kg]
- W_2 スルホン酸基あるいはDEA基導入後の膜の乾燥重量 [kg]
- W_3 ジオール基あるいはEA基導入後の膜の乾燥重量 [kg]
- W_4 ジオール基あるいはEA基導入後の膜の湿潤重量 [kg]
- z タンパク質分子の短軸 [m]
- μ 供給液の粘度 [$Pa \cdot s$]

引用文献 (第5章)

Bagchi, P.; Birnbaum, J. "Effect of pH on the Adsorption of Immunoglobulin G on Anionic Poly(vinyltoluene) Model Latex Particles." *J. Colloid Interface Sci.* 83, 460 (1981).

Baszkin, A.; Lyman, D.J.W. "The Interaction of Plasma Proteins with Polymers. I. Relationship between Surface Energy and Protein Adsorption/Desorption." *J. Biomed. Mater. Res.* 14, 393 (1980).

Hochuli, E. "Large-Scale Chromatography of Recombinant Proteins." *J. Chromatogr.* 444, 293 (1988).

Hrudkova, H.; Svec, F.; Kalal, J. "Reactive Polymers XIV. Hydrolysis of the Epoxide Groups of the Copolymer Glycidylmethacrylate-Ethylenedimethacrylate." *Br. Polym. J.* 9, 238 (1977).

Janzen, R.; Unger, K. K.; Muller, W.; Hearn, M. T. W. "Adsorption of Proteins on Porous and Non-Porous Poly(ethyleneimine) and Tentacle-Type Anion Exchangers." *J. Chromatogr.* 522, 77 (1990).

Kim, M.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "Water Flux and Protein Adsorption of a Hollow Fiber Modified with Hydroxyl Groups." *J. Membr. Sci.* 56, 289 (1991a).

Kim, M.; Saito, K.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Ishigaki, I. "Protein Adsorption Capacity of a Porous Phenylalanine-Containing Membrane Based on a Polyethylene Matrix." *J. Chromatogr.* 586, 27 (1991b).

Muller, W. "New Ion Exchangers for the Chromatography of Biopolymers."

J. Chromatogr. 510, 133 (1990).

Pharmacia LKB Biotech. Affinity Chromatography Catalog; Pharmacia LKB
Biotech.: Tokyo, (1992).

Reynaud, J. A.; Tavernier, J.; Yu, L. T.; Cochet, J. M. "The Adsorption
of RNase A, BSA and Cytochrome C at the Graphite Powder/Liquid
Interface Using in Parallel the Adsorption Isotherm Plot and Linear
Sweep Voltammetry on Graphite Paste Electrode."

Bioelectrochem. Bioenerg. 15, 103 (1986).

Squire, P. G.; Himmel, M. E. "Hydrodynamics and Protein Hydration."

Arch. Biochem. Biophys. 196, 165 (1979).

Wahlgren, M. C.; Arnebrant, T.; Paulsson, M. A. "The Adsorption from
Solution of β -Lactoglobulin Mixed with Lactoferrin or Lysozyme onto
Silica and Methylated Silica Surfaces." J. Colloid Interface Sci.

158, 46-53 (1993).

Yamazaki, Z.; Kanai, F.; Idezuki, Y.; Yamawaki, N.; Inagaki, K.;

Tsuda, N. "Immunoabsorption." Jpn. Artif. Organs. 16, 1203 (1987).

Table 5-1. Properties of protein solution for permeation across the ion-exchange-group-containing hollow-fiber membrane.

	Protein	Buffer
SS-Diol-T fiber	Lysozyme (C ₀ = 0.5 mg/mL)	Phosphate buffer (0.02 M, pH=6.0)
DEA-EA-T fiber	BSA (C ₀ = 5.0 mg/mL)	Tris-HCl buffer (0.02 M, pH=8.0)

Table 5-2. Properties and degree of tentacle binding of various proteins.

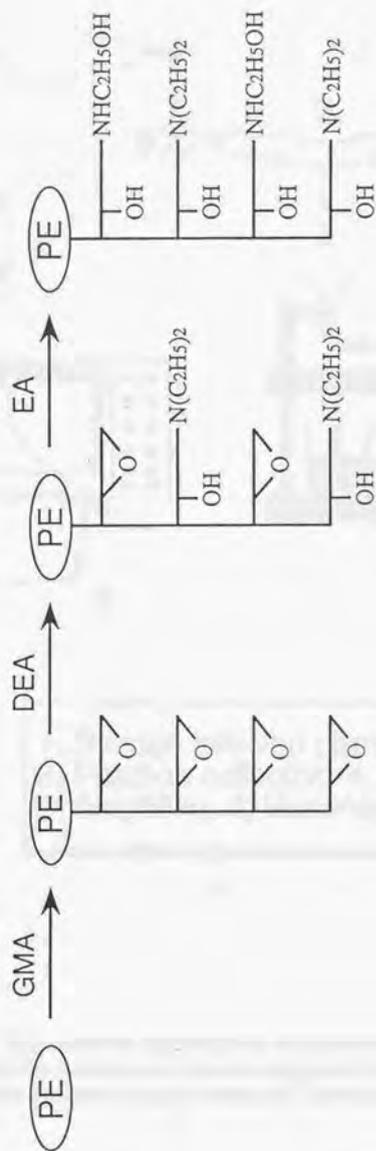
	molecular weight	pI	dimensions	degree of tentacle binding
SS(0.20)-Diol-T fiber				
Cytochrome C	12,400	10.1	2.5 x 2.5 x 3.7 nm	14
Lysozyme	14,300	11.0	4.0 x 4.0 x 5.0 nm	11
Chymotrypsinogen A	25,700	9.5	4.0 x 4.0 x 11.5 nm	22
DEA(0.47)-EA-T fiber				
Lactoglobulin	18,000	5.0	* 3.6 nm	10
BSA	67,500	4.9	4.0 x 4.0 x 11.5 nm	6
BGG	169,000	5.8~7.3	4.4 x 4.4 x 23.5 nm	4

* Stokes diameter

Table 5-3. Binding capacity and elution ratio for various proteins onto polyethylene hollow fiber and diol-group-containing hollow fiber.

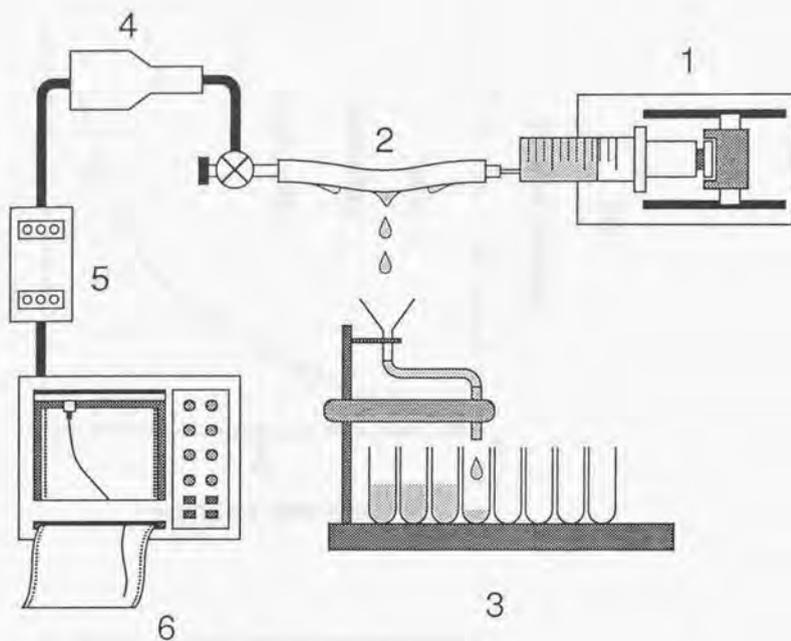
	Binding capacity (g/kg)	q/q_t^*		elution ratio (%)
		end-on	side-on	
Polyethylene hollow fiber				
Cytochrome C	61.3	1.04	1.54	10
Lysozyme	16.8	0.64	0.79	6
Chymotrypsinogen A	61.2	1.29	3.70	30
Lactoglobulin	32.0	0.78	0.78	46
BSA	33.3	0.27	0.77	11
BGG	92.6	0.36	1.91	20
Diol-T fiber				
Cytochrome C	15.8	0.50	0.74	90
Lysozyme	3.2	0.22	0.28	97
Chymotrypsinogen A	17.6	0.69	1.99	98
Lactoglobulin	10.0	0.46	0.46	96
BSA	10.8	0.16	0.46	90
BGG	16.6	0.12	0.64	96

*Theoretical binding capacity for each protein adsorbed as a monolayer with an end-on or side-on orientation on to the hollow fiber.



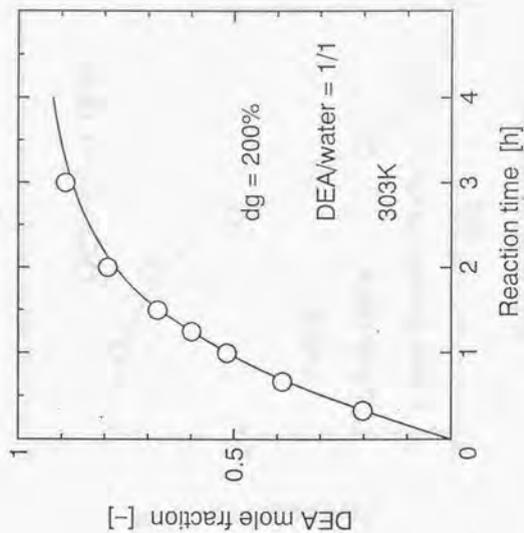
DEA-EA-T fiber

Fig. 5-1. Reaction scheme of DEA-EA-T fiber.

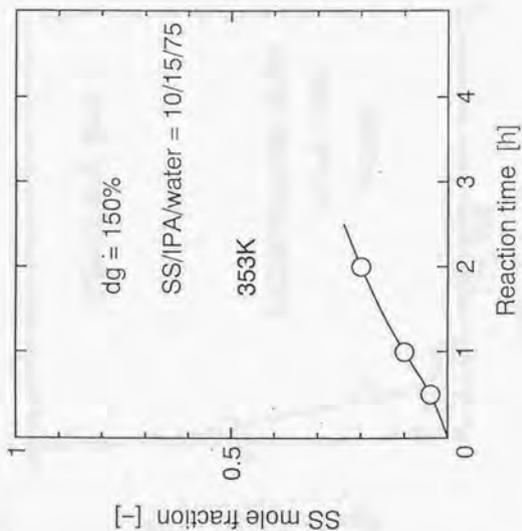


1, Syringe infusion pump; 2, Hollow fiber;
 3, Fraction collector; 4, Pressure sensor;
 5, Amplifier; 6, Recorder

Fig. 5-2. Experimental apparatus for determination of the breakthrough curve of the protein for the microporous ion-exchange membrane and for measurement of the permeation pressure change across the membrane induced by the protein binding.



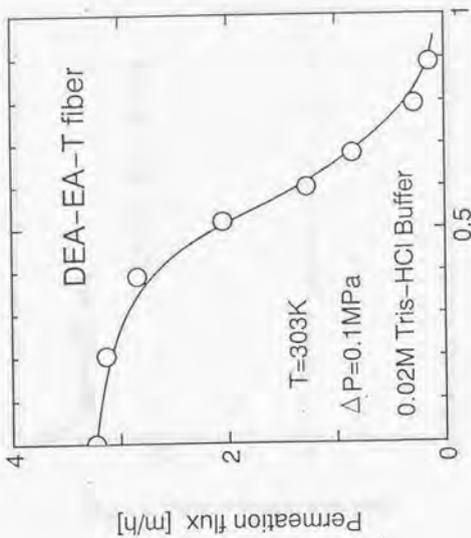
(a)



(b)

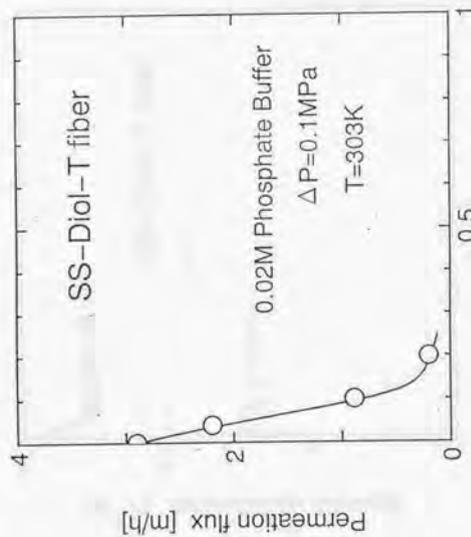
Fig. 5-3. Mole fraction of ion-exchange groups in the grafted polymer branches as a function of reaction time.

(a) SS-Diol-T fiber; (b) DEA-EA-T fiber.



SS mole fraction [-]

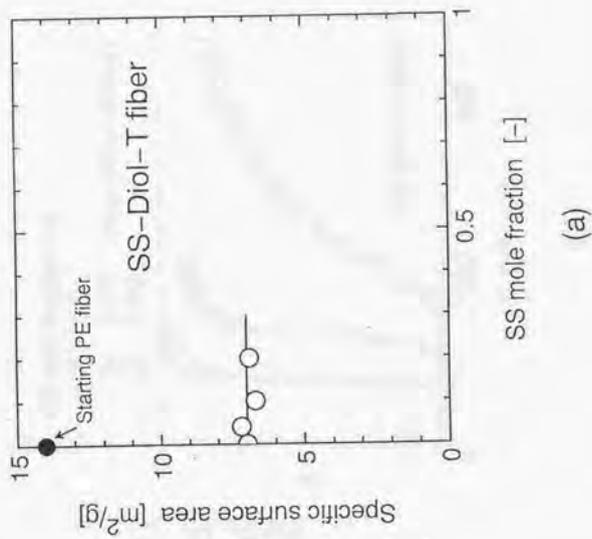
(a)



DEA mole fraction [-]

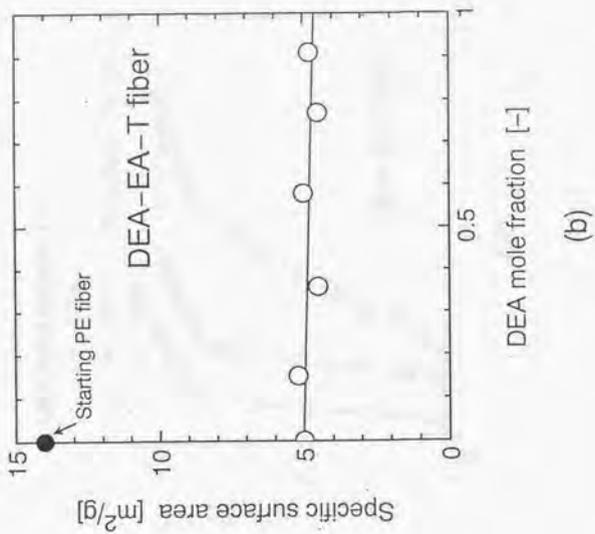
(b)

Fig. 5-4. Permeation flux of buffer solution as a function of mole fraction of ion-exchange groups in the grafted polymer branches.
(a) SS-Diol-T fiber; (b) DEA-EA-T fiber.



SS mole fraction [-]

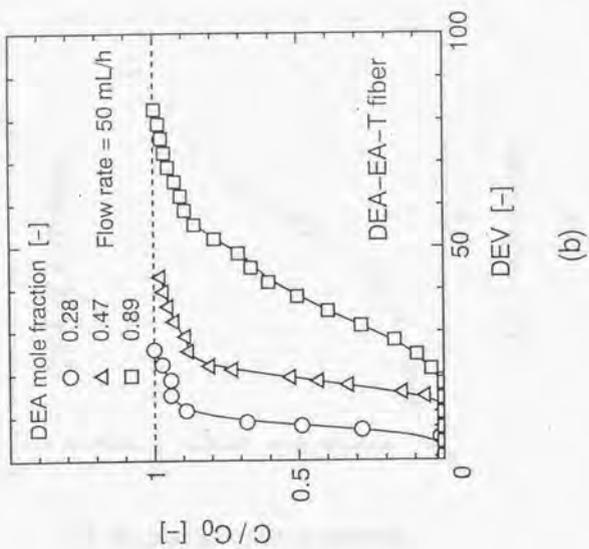
(a)



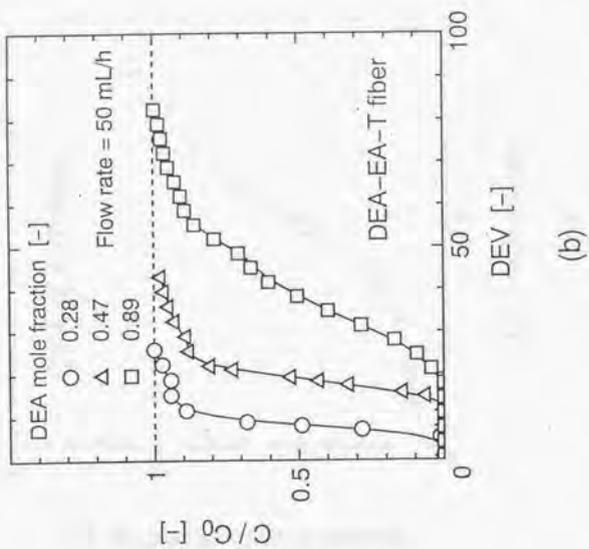
DEA mole fraction [-]

(b)

Fig. 5-5. Specific surface area of tentacle-type ion-exchange membrane as a function of mole fraction of ion-exchange groups in the grafted polymer branches.
 (a) SS-Diol-T fiber; (b) DEA-EA-T fiber.



(a)



(b)

Fig. 5-6. Break through curves of protein across the tentacle-type ion-exchange membrane for different mole fraction of ion-exchange groups.
 (a) SS-Diol-T fiber; (b) DEA-EA-T fiber.

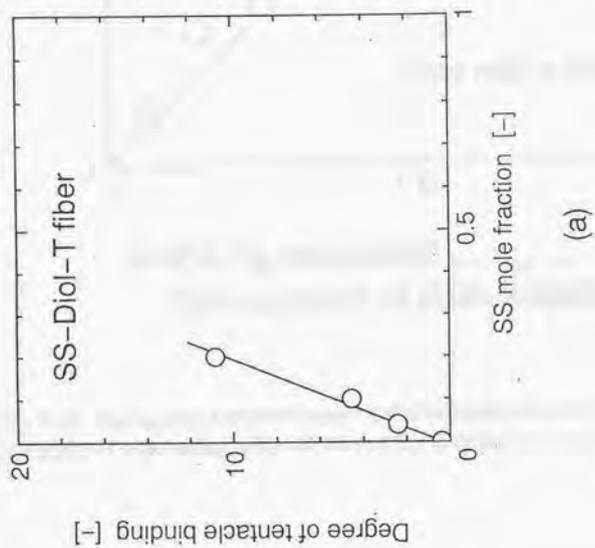
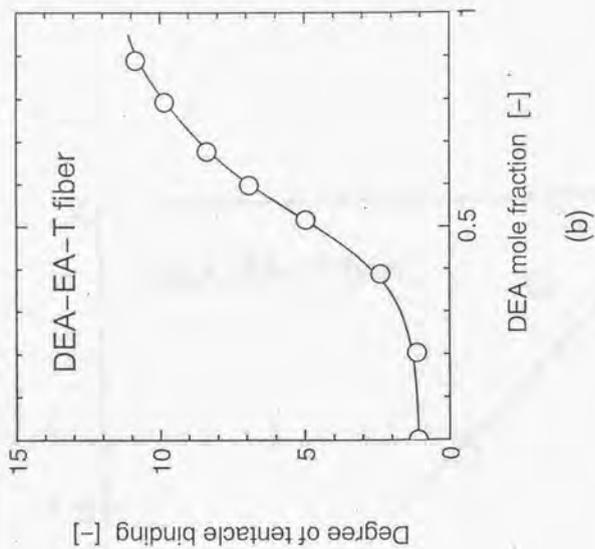


Fig. 5-7. Protein binding capacity of tentacle-type ion-exchange membranes as a function of mole fraction of ion-exchange groups in the graft chain. (a) SS-Diol-T fiber; (b) DEA-EA-T fiber.

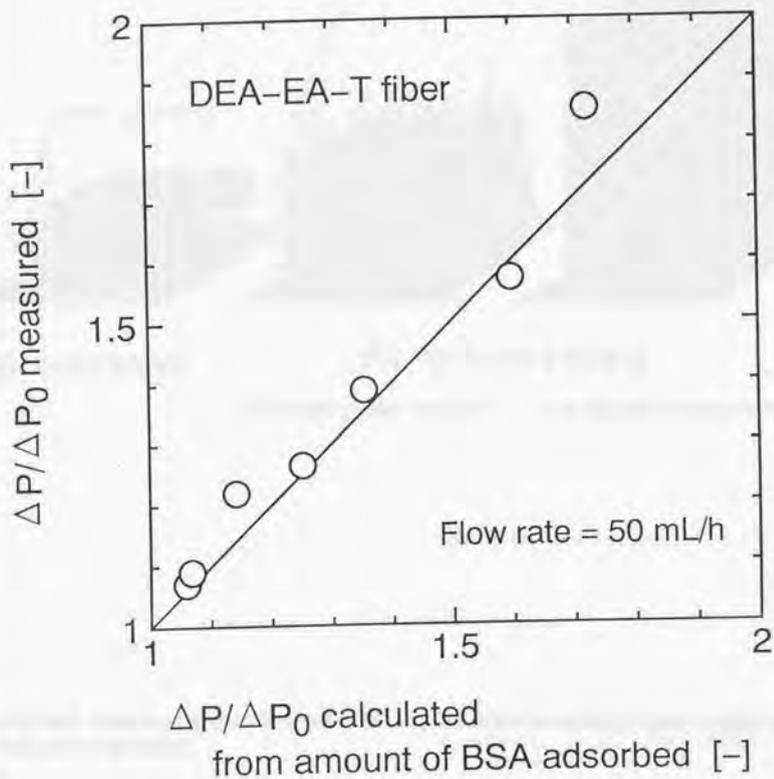
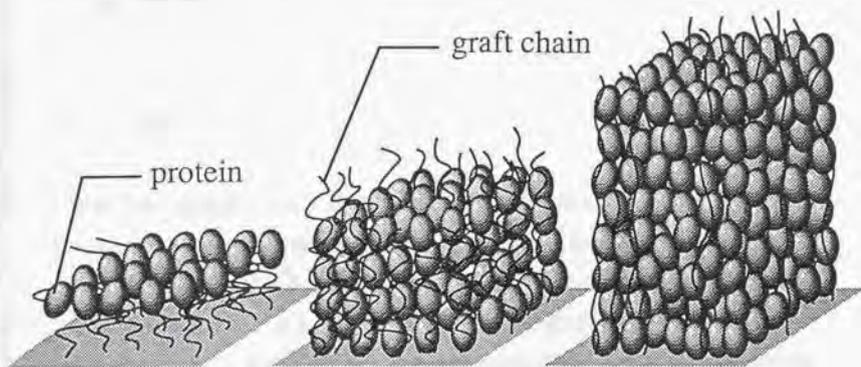


Fig. 5-8. Permeation pressure across the membrane calculated from amount of BSA adsorbed vs permeation pressure across the membrane measured.



(a) monolayer

(b) tentacle binding

(at lower mole fraction)

(at higher mole fraction)

Fig. 5-9. Structure of protein binding to the graft chain for different mole fractions of ion-exchange group

第 6 章

Tentacle 吸着の物理化学的特性および 実用性

6-1 緒言

前章では、放射線グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン膜にグリシジルメタクリレート (GMA) を導入し、亜硫酸ナトリウムとの反応によりエポキシ基をスルホン酸基に、ジエチルアミンとの反応によりエポキシ基をジエチルアミノ (DEA) 基に変換した。得られた膜はタンパク質を多層吸着するテナクル型イオン交換膜であることを見いだした。多孔性膜の細孔表面に、テナクル吸着を発生するイオン交換性ポリマー鎖を固定した材料はこれまでのところ報告されていない。本研究で開発したこの新規な膜を“Porous & Tentacle”型イオン交換膜とよぶことにする。“Porous & Tentacle”型イオン交換膜にタンパク質溶液を透過させたときの分離の原理をFig. 6-1に示す。膜の内面から外面へタンパク質溶液を透過させると、タンパク質は対流に乗ってイオン交換基近傍まで輸送されるため、拡散移動抵抗が無視できる。さらにタンパク質の吸着容量は膜の表面積に依存しないという特長も併せもつ。このような膜を利用することによって、従来のイオン交換ビーズでは実現できなかったタンパク質溶液の高速、大量吸着分離が可能になる。

本章では、放射線グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン製中空糸膜にジエチルアミノ (DEA) 基を導入し、“Porous & Tentacle”型アニオン交換膜を合成する。本章の目的はつぎの3点である。

- (1) タンパク質濃度、pH、塩濃度および温度などのパラメータを変えてこの膜にタンパク質溶液を透過させ、平衡吸着量を測定する。
- (2) タンパク質吸着特性から、グラフト鎖のコンフォメーションについて考察する。
- (3) 本研究で開発した“Porous & Tentacle”型イオン交換膜のモジュールと従来

6-2 実験

1) 基材と試薬

市販のポリエチレン製中空糸状精密濾過膜（旭化成工業（株）製）を基材に用いた。この膜の物性は、内径1.95mm、外径3.01mm、公称孔径0.34 μ mおよび空孔率71%である。試薬にはグリシジルメタクリレート（ $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CHOCH}_2)$ 、GMA）、ジエチルアミン（ $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、DEA）およびエタノールアミン（ $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、EA）を用いた。タンパク質には、牛血清アルブミン（Sigma: Cat.No.L-7030）を用いた。

2) DEA-EA膜の合成および物性測定

DEA-EA膜の合成法については第5章で詳述したので、ここでは省略する。GMAグラフト率を200%に設定し、DEA基モル分率が0~0.89の膜を合成した。

乾燥したDEA-EA膜をメタノールに10分間浸し、続いて純水置換して膜細孔内に純水を満たした。そのときの内径（ d_i ）および外径（ d_o ）を顕微鏡で、長さ（ L ）を定規で測定した。これらの測定値より、DEA-EA膜の膜体積（ V_m ）を求めた。

また、DEA-EA膜を真空乾燥後、比表面積計（Quantasorb, Yuasa Ionics Co.）を用いて、窒素吸着法により、比表面積（ a_v ）を測定した。

3) 透過法によるBSAの吸着および溶出実験

DEA-EA膜にBSA溶液を透過させ、吸着実験をおこなった。吸着実験装置は第5章で説明したものと同一のものを用いた。室温で、輸注ポンプ（ATOM-235, ATOM Co.）を用いて一定流量で、DEA-EA膜にBSA溶液を透過させた。BSAはバッファー（0.02 M Tris-HCl, pH=7.0~9.0）に溶かし、濃度が0.2~10mg/mLになるように調製した。長さ約13cmのDEA-EA膜をI字状にセットし、BSA溶液を膜内面から外面に一定流量で透過させた。膜外面から透過してきた液をフラクションコレクターによって分取し、各フラクションのBSA濃度を280nmの吸光度を測定して求めた。BSA溶液の透過流量は20~100mL/hの範囲でおこなった。BSAの吸着量は破過曲線の積分値より求めた。

$$q = \int_0^{V_0} (C_0 - C) dV_s / W_s \quad [\text{g/g}] \quad (6-1)$$

ここで、 q はBSA吸着量、 C および C_0 はそれぞれ供給液および透過液中のBSA濃度、 V_t は透過液量、 V_0 は C が C_0 に達したときの透過液量である。また、膜の比表面積 (a_v) より、細孔表面にタンパク質がend-on結合で単層吸着したときの吸着容量 (q_1) を計算した。DEA-EA膜にBSAが単層吸着した場合は $q_1=45\text{g/kg}$ と算出された。そしてテンタクル結合度、すなわち吸着容量 (q) の単層吸着量 (q_1) に対する比を求めた。

$$\text{テンタクル結合度} = q/q_1 \quad [-] \quad (6-2)$$

透過液中のBSA濃度が供給液中の濃度と等しくなったことを確認した後、膜にバッファーを10mL透過させ、膜細孔内の洗浄をおこなった。次に溶出液を透過させ、膜に吸着していたBSAを溶出させた。溶出液として、0.5M塩化ナトリウムを含むバッファーを用いた。ここで、溶出率を以下の式で定義した。

$$\text{溶出率} = 100 [(\text{溶出したBSA量}) / (\text{吸着したBSA量} \\ - \text{洗浄によって流出したBSA量})] \quad [\%] \quad (6-3)$$

6-3 結果と考察

1) DEA-EA膜によるBSAの吸着および溶出挙動

DEA(0.49)-EA膜に、20~100mL/hの範囲で流量を変えてBSA溶液を透過させたときの破過曲線をFig. 6-2に示す。縦軸は、供給液中のBSA濃度に対する透過液中のBSA濃度の比である。横軸は無次元化した透過液量 (DEV) である。ここでDEVは、次式のように透過液量 (V_t) を膜体積 (V_m) で割った値である。

$$\text{DEV} = V_t / V_m \quad [-] \quad (6-4)$$

体積流量20~100mL/hは、滞留時間165~33secに相当する。破過曲線は滞留時間によらず一致した。これは、BSAが対流によってDEA基近傍まで輸送されるので、拡散移動抵抗が無視できることを示している。また、溶出曲線のピークは鋭く、流量50mL/hの場合、1DEVで溶出率91%、原液濃度に対する濃縮率は20倍であった。さらに10DEVで、膜に吸着したBSAをほぼ100%を回収することができ、テーリングはなかった。

2) DEA-EA膜によるBSAの繰り返し吸着

Fig. 6-3は、DEA(0.49)-EA膜を用いて、吸着および溶出操作を繰り返しおこなったときのテンタクル結合度および溶出率を示したものである。5回の繰り返し使用においても、膜の吸着性能は変化せず、物理的強度は十分であることが確かめられた。また、溶出率がほぼ100%であることから、エタノールアミノ(EA)基によるタンパク質の非選択的吸着の抑制効果も十分であることが示された。

ここで、タンパク質の吸着や溶出の前後におけるグラフト鎖のコンフォメーションは、つぎのような変化を起こす(Fig. 6-4)。(1)まず、タンパク質溶液透過前のグラフト鎖は、イオン交換基がもつ電荷同士の反発力によって伸長した形態をとっている。(2)そこへ、対流によって運ばれたタンパク質が、イオン交換基をもつグラフト鎖に捕らえられ、積層していく。(3)次に、塩濃度の高い溶出液を透過することによって、対イオンがグラフト鎖中の有効電荷を遮断する。それによって吸着していたタンパク質が溶出するとともに、グラフト鎖が収縮した形態に変化する。(4)洗浄液として、塩濃度の低いバッファーを透過させると、再びグラフト鎖中の有効電荷が増すので、伸長した形態にもどる(Saito et al., 1989)。このようにグラフト鎖のコンフォメーションが可逆的に変化できるという特性をもつこともグラフト重合膜の繰り返し使用に必要な条件である(Okahata et al., 1987)。第3章で述べたように、本研究で合成したグラフト鎖は、高分子電解質や高分子ゲルと同じように外部環境の変化にともなって可逆的なコンフォメーション変化を起こすことが確認されている。

3) DEA-EA膜のBSA吸着平衡関係

異なったDEA基モル分率を有するDEA-EA膜に、0.2~10mg/mLの範囲で供給液中のBSA濃度(C_0)を変化させて透過させ、平衡吸着量を測定した。それぞれの膜の吸着平衡関係をFig. 6-5に示す。いずれの膜においても、平衡吸着量より算出したテンタクル結合度は、この濃度範囲ではBSA濃度(C_0)によらず、一定であった。

一般にイオン交換体へのタンパク質の吸着平衡関係は、ラングミュア式によって整理できる(Whitley et al., 1989; Huang et al., 1991; James & Do, 1991; Bowen & Hughes, 1993)。これに対し、テンタクル型イオン交換体へのタンパク質の吸着平衡関係は、Hill吸着等温線に従うと報告されている(Janzen et al.,

1990)。本研究の場合、膜透過法によって平衡吸着量を求めたので、0.2mg-BSA/mL以下の低濃度での実験は不可能である。しかしながら、0.2~1mg/mLという実用的な濃度範囲では、平衡吸着量が飽和吸着量に一致することがわかった。これより、“Porous & Tentacle”型イオン交換膜によって、低濃度の溶液中からもBSAを効率よく回収できることが示された。

4) DEA-EA膜のBSA吸着性能における外部パラメータ依存性

DEA-EA膜に透過するBSA溶液のpH、NaCl濃度および温度を変え、吸着性能に及ぼす影響を調べた。架橋された高分子担体に直接イオン交換基が固定されている場合は、イオン交換基とタンパク質との静電的相互作用の強さがそのまま平衡吸着量に反映される。これに対し、グラフト鎖という架橋されていないフレキシブルな高分子鎖にイオン交換基が固定されている場合は、外部パラメータ（pH、塩濃度、温度）の変化とともにグラフト鎖のコンフォメーションにも変化が生じる。したがって、平衡吸着量は①タンパク質の吸着できるスペース、および②イオン交換基とタンパク質との静電的相互作用という2つのファクターによって決まる。①は、膜の透過流束から細孔相当径 (r/r_0) を算出することによって、定性的に評価できる。ここでは、pH=8.0、NaCl濃度=0M、温度=30℃のバッファーを標準バッファーとし、この液を膜に透過させたときの細孔径 (r_0) を基準にとった。そして、外部パラメータ（pH、NaCl濃度、温度）を変化させたバッファーを膜に透過させたときの細孔径 (r) を測定し、 r/r_0 を算出した。 r/r_0 の導出法についてはAppendixで説明した。一方、②は、従来のイオン交換体の平衡吸着量を調べることによって定性的ではあるが評価できる。これらの値とDEA-EA膜におけるBSA平衡吸着量の実測値との相関関係を考察した。

タンパク質溶液中のNaCl濃度とBSAの平衡吸着量および膜の細孔相当径との関係をFig. 6-6(a)に示す。NaCl濃度の増加とともに、BSAの平衡吸着量は減少した。また、膜の細孔相当径の測定結果から、NaCl濃度の増加とともにグラフト鎖が収縮し、BSAの吸着スペースが減少することがわかった。さらに、Fig. 6-6(b)に示すように、DEA基を有する市販のアニオン交換体でもイオン強度の増加とともにBSAの吸着量は大きく減少することが確かめられている(Hou and Mandaro, 1986)。これは、対イオンがイオン交換基の有効電荷を遮断するためである。以上の結果が

ら、NaCl濃度の増加とともに、①と②の両方のファクターがBSAの平衡吸着量を減少させる方向に作用したと結論できる。

タンパク質溶液のpHとBSAの平衡吸着量および膜の細孔相当径との関係をFig. 6-7(a)に示す。pHの増加とともに、BSAの平衡吸着量は減少した。また、膜の細孔相当径の測定結果から、pHの増加とともにグラフト鎖が収縮し、BSAの吸着スペースが減少することがわかった。さらに、Fig. 6-7(b)に示すように、DEA基を有する市販のアニオン交換体でもpH>7の場合、pHの増加とともにBSAの吸着量は減少することが確かめられている(Hou and Mandaro, 1986)。これは、担体に固定されたDEA基のpKaが6~8付近にあり、高いpH中ほどDEA基がイオン化している割合が少ないからである。以上の結果から、pHの増加とともに、①と②の両方のファクターがBSAの平衡吸着量を減少させる方向に作用したと結論できる。

温度とBSAの平衡吸着量および膜の細孔相当径との関係をFig. 6-8に示す。温度が低下した場合、BSAの平衡吸着量はやや低下した。これに対し、この温度範囲(5~30℃)では、グラフト鎖のコンフォメーションは一定であることが膜の細孔相当径の値から明らかになった。DEA基を有する市販のアニオン交換体を用いて温度とBSAの吸着量との関係を調べた既往の研究を見つけることができなかった。しかしながら少なくとも、本研究の結果から、温度の低下によってBSAの平衡吸着量が減少した原因は、①BSAの吸着できるスペースが減少したのではなく、②BSAとDEA基の静電的相互作用が弱くなったことによると推測できる。

5) "Porous & Tentacle" 型イオン交換膜とイオン交換ビーズの比較

本研究で合成した中空糸状"Porous & Tentacle"型イオン交換膜(DEA-EA膜)のモジュールと、テントクル型イオン交換ビーズ充填カラムを用いて、BSAの吸着分離操作をおこなったときの処理速度を推算して比較した。推算方法についての詳細はAppendixに示す。ここでは、膜モジュールおよびビーズ充填カラムにBSA溶液を透過させ、BSAが破過するまでの過程に限って処理速度を比較したので、それぞれのBSA吸着容量については考慮していない。

中空糸膜モジュールおよびビーズ充填カラムの容積を1000cm³に統一した。透過圧力0.1MPaのもとで、中空糸膜モジュールの体積流量は200cm³/sであり、このときのカラム内での液の滞留時間は1.5sである。一方、BSAの拡散距離を膜の細孔径

に近似した場合の拡散時間は1.5msである。この値は滞留時間の約1/1000なのでほとんど無視できるほど小さい。したがってBSA吸着処理速度は流速に比例すると考えてよい。

ビーズ充填カラムの場合、ビーズ内部でのBSAの拡散時間が、カラム内での液の滞留時間の1/100になるように液の流速を設定した。このとき、膜モジュールの場合と同じようにBSAの吸着処理速度は流速に比例する。なお、BSAの拡散距離はビーズ直径に等しいと仮定した。これらの条件および仮定のもとでは、ビーズ直径(d_p)と体積流量(Q)との関係はFig. 6-10に示すような関係になる。

ビーズ充填カラムの操作圧力(ΔP)を0.1MPaにした場合、Kozeny-Carmanの式を用いて、この体積流量を実現させるためのカラムの高さを決定できる。ビーズ直径(d_p)とカラム高さ(L_c)およびカラム直径(d_c)との関係をFig. 6-11に示す。カラム体積1000cm³、操作圧力0.1MPaという条件下で、DEA-EA膜と同じ処理速度(200cm³/s)でBSAの吸着分離操作をおこなうためには直径1.36μmのイオン交換ビーズを直径112cm、高さ0.102cmのカラムに充填しなければならない。これは、ビーズをつぶして、直径約1m、厚さ約1mmの平たい膜にした場合とほとんど同じである。多孔性ビーズと多孔性膜が、高分子マトリクス内にサブミクロンの孔が三次元的につながって開いているという点で似たような物理構造をしていると考えれば当然の結果である。

市販のテンタクル型イオン交換ビーズ(LiChrospher-TMAE, MERCK)はビーズ直径5μm、細孔径0.1μmの多孔性シリカビーズに水酸基を導入し、さらにトリメチルアミノエチル(TMAE)基を有するポリマー鎖を導入することによってつくられる(Muller, 1990)。DEA-EA膜のモジュール容積当たりの吸着容量は14.0g/L、LiChrospher-TMAEビーズのカラム容積当たりの吸着容量は61.2g/Lであった。吸着容量の算出法についての詳細はAppendixで示した。ビーズ充填カラムで1回の吸着-溶出操作で回収できる量のBSAを膜モジュールを用いて回収するためには、吸着と溶出操作を4.5回繰り返す必要がある。

DEA-EA膜とLiChrospher-TMAEビーズの表面積当たりのBSA吸着量が等しいと仮定すると、モジュールおよびカラム全体での膜およびビーズ表面積が吸着容量を決めるといえる。ビーズをカラムに充填したときの空隙率は0.4であるのに対し、膜をモジュール化したときの空隙率は0.6であるので、充填率の低さという点で膜モ

ジュールは不利である。また、ビーズの細孔径が約 $0.1\mu\text{m}$ であるのに対し、膜の細孔径は約 $0.3\mu\text{m}$ であるので、同じ空孔率をもっていてもBSAが吸着できる細孔表面部の面積は膜の方が小さく、この点でも膜モジュールは不利である。しかしながら、ビーズ充填カラムを用いてDEA-EA膜モジュールと同じ処理速度でBSAを吸着分離するためには、直径 $1.36\mu\text{m}$ という小さい粒径でありながら機械的強度の高い多孔性ビーズをつくらなければならないこと、あるいは直径約 1m という広い面積をもつカラムの断面方向に均一にBSAを分散させなければならないことなどの課題をクリアする必要がある、実用的には非常に困難である。これに対し、中空糸膜モジュールを利用した場合は、コンパクトな装置で済ませることができるので、実用的にも非常に操作性がよい。

6-4 結言

放射線グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン製中空糸膜にグリシジルメタクリレート(GMA)をグラフト重合し、続いてこのグラフト鎖にジエチルアミノ(DEA)基およびエタノールアミノ(EA)基を導入して“Porous & Tentacle”型イオン交換膜を合成した。この膜(DEA-EA膜)に牛血清アルブミン(BSA)を含む溶液を透過させ、その吸着性能を検討した結果、以下のような結論を得た。

(1) 滞留時間 $33\sim 165\text{sec}$ の範囲でBSAの破過曲線は滞留時間によらず一致し、BSAがDEA基に吸着されるまでの拡散移動抵抗が無視できることが示された。

(2) DEA-EA膜に吸着したBSAは100%回収することができ、エタノールアミノ(EA)基によってBSAの非選択的吸着が完全に抑制されていることが示された。また、吸着と溶出操作を5回ずつ繰り返しても、膜の吸着性能は変化しなかった。これより、膜が十分な物理的強度をもつこと、およびグラフト鎖のコンフォメーション変化が可逆的であることが確認された。

(3) BSA濃度0.2~10mg/mLの範囲で、DEA-EA膜のBSA平衡吸着量はBSA濃度によらず一定であった。これより、DEA-EA膜によって低濃度の溶液中からもBSAを効率よく捕集できることが示された。

(4) pHおよびNaCl濃度の増加とともにグラフト鎖は収縮し、テンタクル結合度は低下した。温度の低下とともにテンタクル結合度はわずかに低下したがグラフト鎖のコンフォメーションは変化しなかった。

(5) モジュール容積1000cm³、操作圧力0.1MPaという条件で、DEA-EA膜モジュールを用いた場合のBSA吸着処理速度は200cm³/sであった。イオン交換ビーズ充填カラムを用いてこの膜モジュールと同じ処理速度を得るためには、直径1.36μmのビーズを内径112cm、高さ0.102cmのカラムに充填する必要があり、実用的に困難であることがわかった。

1) 外部パラメータを変化させたときの細孔径推算式の導出法

pH=8.0、NaCl濃度=0M、温度=30℃の標準バッファー溶液を基材およびDEA-EA膜に透過させたときの透過流束をそれぞれ $F_{n,0}$ および F_n とすると、

$$F_{n,0} = n_0 \pi r_0^4 \Delta P / 8 \mu D_{T,0} \quad [\text{cm/s}] \quad (6-5)$$

$$F_n = n \pi r_n^4 \Delta P / 8 \mu D_T \quad [\text{cm/s}] \quad (6-6)$$

よって、

$$F_n / F_{n,0} = (n/n_0)(r_n/r_0)^4 (D_{T,0}/D_T) \quad [-] \quad (6-7)$$

ここで、 n は膜内面積あたりの細孔数、 r は細孔相当半径、 D_T は膜厚、 μ は液の粘度、 ΔP は膜の透過圧力を示す。また、添字0は基材の物性値、添字 n はBSA標準溶液(pH=8.0、NaCl濃度=0M、温度=30℃)を透過させたときの物性値を表す。

一方、外部パラメータ(pH、NaCl濃度、温度)を変えたBSA溶液を基材およびDEA-EA膜に透過させたときの透過流束をそれぞれ F_0 および F とすると、

$$F_0 = n_0 \pi r_0^4 \Delta P / 8 \mu D_{T,0} \quad [\text{cm/s}] \quad (6-8)$$

$$F = n \pi r^4 \Delta P / 8 \mu D_T \quad [\text{cm/s}] \quad (6-9)$$

よって

$$F/F_0 = (n/n_0)(r/r_0)^4 (D_{T,0}/D_T) \quad [-] \quad (6-10)$$

(6-7)および(6-10)式より、

$$r/r_n = [(F/F_0)/(F_{n,0}/F_n)]^{1/4} \quad [-] \quad (6-11)$$

(6-11)式の右辺はすべて透過流束の測定値なので、これらを使って細孔径比 r/r_n を求めることができる。

2) 膜モジュールとビーズ充填カラムでのBSA吸着処理速度の比較

(1) 膜モジュール

モジュールの直径(d_m)を8.0cm、高さ(L_m)を19.9cmとすれば、モジュール容積(V_m)は約1000cm³になる。

$$\begin{aligned}
 V_e &= 1/4 \cdot \pi \cdot d_o^2 \cdot L_e \\
 &= 0.25 \times 3.14 \times 8.0 \times 8.0 \times 19.9 \\
 &= 1000 \text{ [cm}^3\text{]}
 \end{aligned}$$

内径 (d_i) が 0.28cm、外径 (d_o) が 0.45cm の DEA(0.47)-EA 膜を 200 本充填することによって、前に述べたサイズのモジュールをつくることができる。膜の内面から外面に BSA を含む溶液を透過させた場合を考える。このとき、膜の内側 (供給液側) に存在する空間のモジュール容積基準の空隙率 (ϵ_i) は、

$$\begin{aligned}
 \epsilon_i &= (N \cdot 1/4 \cdot \pi \cdot d_i^2 \cdot L_e) / V_e \\
 &= (200 \times 0.25 \times 3.14 \times 0.28^2 \times 19.9) / 1000 \\
 &= 0.24 \text{ [-]}
 \end{aligned}$$

一方、膜の外側 (透過液側) に存在する空間のモジュール容積基準の空隙率は、

$$\begin{aligned}
 \epsilon_o &= 1 - ((N \cdot 1/4 \cdot \pi \cdot d_o^2 \cdot L_e) / V_e) \\
 &= 1 - ((200 \times 0.25 \times 3.14 \times 0.45^2 \times 19.9) / 1000) \\
 &= 0.37 \text{ [-]}
 \end{aligned}$$

全空隙率 (ϵ) は、

$$\begin{aligned}
 \epsilon &= \epsilon_i + \epsilon_o \\
 &= 0.24 + 0.37 \\
 &= 0.61 \text{ [-]}
 \end{aligned}$$

したがって、液の流動に必要な空隙は十分に備わっている。

透過圧力 (ΔP) が 0.1MPa のとき、DEA-EA 膜の膜内面積 (S) 基準の線流速 (u) は 5.68×10^{-2} cm/s であるから、モジュール全体での体積流量は

$$\begin{aligned}
 Q &= N \cdot u \cdot S \\
 &= 200 \times (5.68 \times 10^{-2}) \times (3.14 \times 0.28 \times 19.9) \\
 &= 199 \text{ [cm}^3\text{/s]}
 \end{aligned}$$

BSA の液中での拡散係数は 6.15×10^{-7} cm²/s である (Horiike et al., 1983)。

BSA がイオン交換基に到達するまでの拡散距離 (L_D) を膜の細孔径 (約 0.3 μ m) に近似した場合、細孔内での BSA の拡散時間 (t_D) に対する膜内での液の滞留時間 (t_r) の比 (Pe , ペクレ数) は、次のように計算できる。

$$\begin{aligned}
 t_D &= L_D^2 / D \\
 &= (0.3 \times 10^{-4})^2 / (6.15 \times 10^{-7})
 \end{aligned}$$

$$= 1.47 \times 10^{-3} \text{ [s]}$$

$$\begin{aligned} t_r &= (N \cdot 1/4 \cdot \pi \cdot (d_o^2 - d_i^2) \cdot L_c \cdot \varepsilon) / Q \\ &= (200 \times 0.25 \times 3.14 \times (0.45^2 - 0.28^2) \times 19.9 \times 0.77) / 199 \\ &= 1.50 \text{ [s]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Pe &= t_o / t_r \\ &= (1.47 \times 10^{-3}) / 1.50 \\ &= 9.80 \times 10^{-4} \text{ [-]} \end{aligned}$$

このペクレ数は十分小さいので、BSAの拡散過程は総括の処理速度には全く影響しない。ただし、膜の空孔率 (ε_m) は含水率の測定値から求め、DEA(0.47)-EA膜の場合、 $\varepsilon_m = 0.77$ であった。

(2) ビーズ充填カラム

カラム容積 (V_c) を一定 (1000 cm^3) にして、カラム直径 (d_c) およびカラム高さ (L_c) を変化させることができるとする。この円筒型カラムにいろいろなサイズのテンタクル型イオン交換ビーズを充填する場合を考える。ビーズ細孔内では、BSAが拡散によってイオン交換基まで到達する。BSAの拡散距離 (L_D) をビーズ直径 (d_p) に近似する。カラム内での液の滞留時間 (t_r) に対するBSAの拡散時間 (t_D) の比、すなわちペクレ数 (Pe) が0.01になるように体積流量 (Q) を決めた。空隙率 (ε) は既往の文献に従い、 $\varepsilon = 0.4$ に設定する (Arnolds et al., 1985)。

$$\begin{aligned} Pe &= t_D / t_r \\ &= (d_p^2 / D) / (V_c \cdot (1 - \varepsilon) / Q) \\ \therefore Q &= Pe \cdot V_c \cdot (1 - \varepsilon) \cdot D / d_p^2 \\ &= 0.01 \times 1000 \times 0.6 \times (6.15 \times 10^{-7}) / d_p^2 \\ &= (3.69 \times 10^{-8}) / d_p^2 \text{ [cm}^3/\text{s]} \end{aligned} \tag{6-12}$$

Kozeny-Carmanの式より、

$$\Delta P = (36 \cdot K \cdot (1 - \varepsilon)^2 \cdot \mu \cdot u \cdot L_c) / (\varepsilon^3 \cdot d_p^2) \text{ [Pa]} \tag{6-13}$$

操作圧力 (ΔP) を0.1MPaに設定して、ある決まった線流速 (u) を得るためにはカラム高さ (L_c) を調節しなければならない。ここで、線流速 (u) と体積流量 (Q) との関係は、

$$u/L_c = Q/V_c$$

$$\begin{aligned} \therefore u &= Q/V_c \cdot L_c \\ &= (Pe \cdot V_c \cdot (1-\varepsilon) \cdot D/d_p^2)/V_c \cdot L_c \\ &= Pe \cdot (1-\varepsilon) \cdot D \cdot L_c / d_p^2 \quad [\text{cm/s}] \end{aligned} \quad (6-14)$$

であるから、これを(6-13)に代入して、

$$\begin{aligned} \Delta P &= (36 \cdot K \cdot (1-\varepsilon)^2 \cdot \mu \cdot Pe \cdot D \cdot L_c^2)/(\varepsilon^2 \cdot d_p^4) \\ \therefore L_c &= ((\Delta P \cdot \varepsilon^2)/(36 \cdot K \cdot (1-\varepsilon)^2 \cdot \mu \cdot Pe \cdot D))^{1/2} \cdot d_p^2 \quad [\text{cm}] \end{aligned} \quad (6-15)$$

Kの値はビーズの配列によって異なるが通常 $K=5$ である。BSA溶液の粘度 (μ) は $8.8 \times 10^{-4} \text{Pa} \cdot \text{s}$ **であった。これらの値を(6-15)式に代入して、

$$\begin{aligned} L_c &= ((0.1 \times 10^5) \times 0.4^2)/(36 \times 5 \times (1-0.4)^2 \times (8.8 \times 10^{-4}) \times 0.01 \\ &\quad \times (6.15 \times 10^{-7}))^{1/2} \times d_p^2 \\ &= (5.51 \times 10^2) \times d_p^2 \quad [\text{cm}] \end{aligned} \quad (6-16)$$

したがって、ビーズ直径 (d_p) を与えると、(6-12)および(6-16)式より、体積流量 (Q) およびカラム高さ (L_c) が決定される。さらに、カラム高さ (L_c) が決まると、次式を用いてカラム直径 (d_c) も決まる。

$$\begin{aligned} V_c &= 1/4 \cdot \pi \cdot d_c^2 \cdot L_c \\ \therefore d_c &= (V_c/(1/4 \cdot \pi \cdot L_c))^{1/2} \\ &= (1000/(0.25 \times 3.14 \times L_c))^{1/2} \\ &= 35.7 / L_c^{1/2} \quad [\text{cm}] \end{aligned} \quad (6-17)$$

カラム容積 1000cm^3 、操作圧力 0.1MPa という条件下で、DEA-EA膜モジュールを用いた場合と同じBSA吸着処理速度 ($Q=200 \text{cm}^3/\text{s}$) を得るためには、直径 $1.36 \mu\text{m}$ のイオン交換ビーズを直径 112cm 、高さ 0.102cm のカラムに充填しなければならない。

**多孔性ポリエチレン膜に一定の透過圧力下で水およびBSA溶液を透過させたときの透過流速をそれぞれ F_w および F とすると、Hagen-Poiseuilleの式より、

$$F_w = n \pi r^4 \Delta P / 8 \mu D_T \quad [\text{cm/s}] \quad (6-18)$$

$$F = n \pi r^4 \Delta P / 8 \mu D_T \quad [\text{cm/s}] \quad (6-19)$$

よって、

$$F_w/F = \mu / \mu_w \quad [-]$$

(6-20)

水の粘度 (μ_w) は $8.0 \times 10^{-4} \text{Pa}\cdot\text{s}$ (30°C) であるから、これと透過流束の測定値より、BSA溶液の粘度 (μ) $8.8 \times 10^{-4} \text{Pa}\cdot\text{s}$ を得た。

3) DEA-EA膜モジュールとLiChrospher-TMAEビーズ充填カラムのBSA吸着容量の比較

膜の有効長 (L) が 6.0cm、有効重量 (W_s) が 0.196g の DEA(0.47)-EA膜の BSA 飽和吸着量 (q) は 0.108g/g-fiber である。ただしこの値は、BSA を 0.02M の Tris-HCl バッファー (pH=8.0、NaCl 濃度=0.5M、温度=30°C) に溶かし、膜に透過させたときに得られた飽和吸着量である。DEA(0.47)-EA膜を 200 本充填した直径 (d_c) 8.0cm、高さ (L_c) 19.9cm、容積 (V_c) 1L であるモジュールの場合、モジュール容積当たりの BSA 吸着容量 (q_c) は次のように計算できる。

$$\begin{aligned} q_c &= N \cdot q \cdot W_s \cdot (L_c/L) / V_c \\ &= 200 \times 0.108 \times 0.196 \times (19.9/6.0) / 1 \\ &= 14.0 \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

一方、市販のテタクル型イオン交換ビーズ (LiChrospher-TMAE, MERCK) の BSA 吸着容量 (q) は 102g/L である (Janzen et al., 1990)。ただしこの値は、BSA を 0.02M の Tris-HCl バッファー (pH=8.3、NaCl 濃度=0.5M、温度=25°C) に溶かし、ビーズ充填カラムに流したときに得られた飽和吸着量である。容積 (V_c) が 1L である円筒型カラムに、空隙率 (ε) が 0.4 になるようにこのイオン交換ビーズを充填した場合、カラム容積当たりの BSA 吸着容量 (q_c) は次のように計算できる。

$$\begin{aligned} q_c &= q \cdot V_c \cdot (1-\varepsilon) / V_c \\ &= 102 \times (1-0.4) \\ &= 61.2 \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

使用記号

a.	膜の比表面積 [cm ² /g]
C	透過液のタンパク質濃度 [g/cm ³]
C ₀	供給液のタンパク質濃度 [g/cm ³]
d _c	カラムおよびモジュールの直径 [cm]
d _i	膜の内径 [cm]
d _o	膜の外径 [cm]
d _p	ビーズの粒径 [cm]
D	タンパク質の拡散係数 [cm ² /s]
DEV	無次元化した透過液量 [-]
D _τ	膜厚 [cm]
F	膜透過流束 [cm/s]
L	膜の長さ [cm]
L _c	カラムおよびモジュールの高さ [cm]
L _D	タンパク質の細孔内拡散距離 [cm]
n	全細孔数 [-]
N	モジュール化した中空糸膜の本数 [-]
ΔP	透過圧力 [Pa]
q	平衡吸着量 [g/g]
q _c	カラムおよびモジュール容積基準の吸着容量 [g/cm ³]
q _v	単層吸着量 [g/g]
Q	体積流量 [cm ³ /s]
r	細孔半径 [cm]
S	膜内面積 [cm ²]
t _D	細孔内でのタンパク質の拡散時間 [s]
t _r	カラム内および膜内での液の滞留時間 [s]
u	カラム内およびモジュール内での液の線流速 [cm/s]
V _c	カラムおよびモジュール容積 [cm ³]
V _t	透過液量 [cm ³]

- V_m 膜体積 [cm³]
 V_s CがC₀に達したときの透過液量 [cm³]
 W_s DEA-EA膜の重量 [g]
 ϵ カラムおよびモジュール内の全空隙率 [-]
 ϵ_i 中空糸膜内側の空隙率 [-]
 ϵ_o 中空糸膜外側の空隙率 [-]
 ϵ_m 膜の空隙率 [-]
 μ 供給液の粘度 [Pa·s]

添字

- 0 基材
 n 標準バッファー (pH=8.0、NaCl濃度=0M、温度=30℃) 透過時の物性値
 w 純水透過時の物性値

引用文献 (第6章)

- Arnold, F. H.; Blanch, H. W.; Wilke, C. R. "Analysis of Affinity Separations I: Predicting the Performance of Affinity Adsorbers." Chem. Eng. J. 30, B9 (1985).
- Bowen, W. R.; Hughes, D. T. "Ion Exchange of Proteins: A Microcalorimetric Study of the Adsorption of Bovine Serum Albumin on Anion-Exchange Materials." J. Colloid Interface Sci. 158, 395 (1993).
- Horiike, K.; Tojo, H.; Yamano, T.; Nozaki, M. "Interpretation of the Stokes Radius of Macromolecules Determined by Gel Filtration Chromatography." J. Biochem. 93, 99 (1983).
- Hou, K. C.; Mandaro, R. M. "Bioseparation by Ion Exchange Cartridge Chromatography." Bio Techniques 4, 358 (1986).
- Huang, J. X.; Schudel, J.; Guiochon, G. "Adsorption Behavior of Some Proteins on the TSK-DEAE 5PW Anion Exchanger." J. Chromatogr. Sci. 29, 122 (1991).
- James, E. A.; Do, D. D. "Equilibria of Biomolecules on Ion-Exchange Adsorbents." J. Chromatogr. 542, 19 (1991).
- Janzen, R.; Unger, K. K.; Muller, W.; Hearn, M. T. W. "Adsorption of Proteins on Porous and Non-Porous Poly(ethyleneimine) and Tentacle-Type Anion Exchangers." J. Chromatogr. 522, 77 (1990).
- Muller, W. "New Ion Exchangers for the Chromatography of Biopolymers." J. Chromatogr. 510, 133 (1990).

Okahata, Y.; Noguchi, H.; Seki, T. "Permeability Control of Polymer-Grafted Capsule Membranes Responding to Ambient pH Changes." *Macromolecules*, 20, 15 (1987).

Saito, K; Ito, M.; Yamagishi, H.; Furusaki, S.; Sugo, T.; Okamoto, J. "A Novel Hollow Fiber for the Removal of Metal Ion during Permeation: Preparation by Radiation-Induced Cograftering of a Cross-Linking Agent with Reactive Monomer." *Ind. Eng. Chem. Res.* 28 1808 (1989b).

Whitley, R. D.; Wachter, R; Liu, F.; Wang, N. H. L. "Ion-Exchange Equilibria of Lysozyme, Myoglobin and Bovine Serum Albumin." *J. Chromatogr.* 465, 137 (1989).

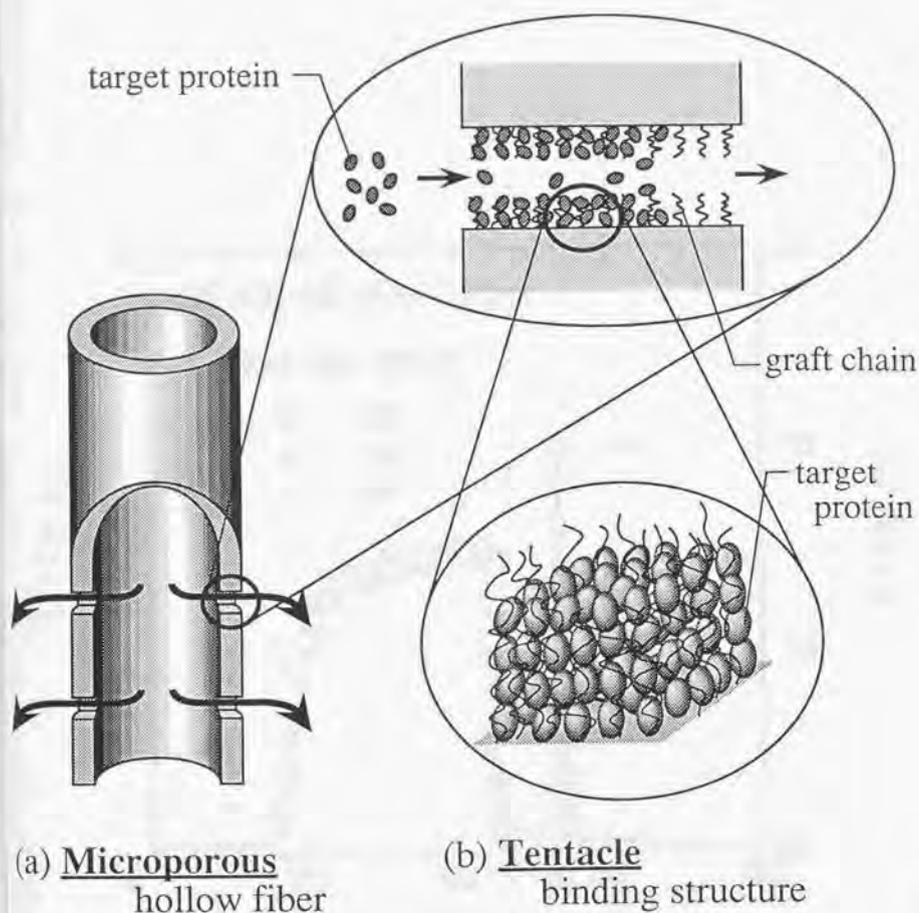


Fig. 6-1. Principle of "Porous & Tentacle" ion-exchange membrane: ion-exchange-group-containing polymer chain was immobilized onto the micropore surface of a microporous membrane.

(a) Convection of the liquid across the hollow fiber through its pores minimizes the diffusion path of the proteins to the ion-exchange groups on the grafted polymer branches.

(b) The grafted polymer chain with a high mole fraction of the ion-exchange group expanded toward the micropore interior three-dimensionally and retained the protein in a tentacle-like manner.

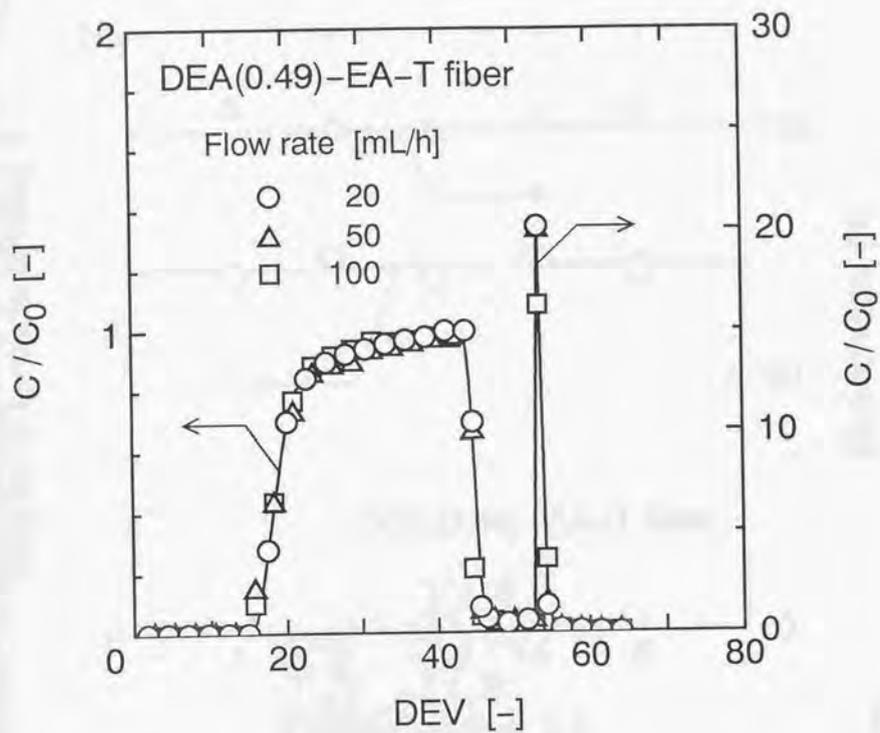


Fig. 6-2. Breakthrough and elution curves of BSA across the DEA-EA-T fiber as a function of flow rate.

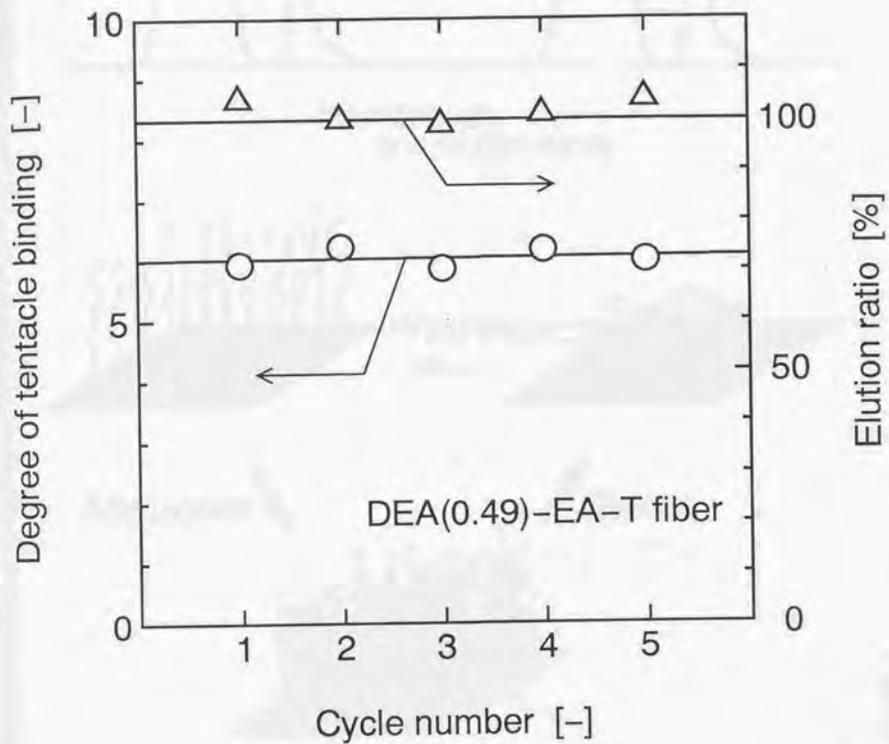


Fig. 6-3. Degree of tentacle binding and elution ratio vs cycle number of repeated use.

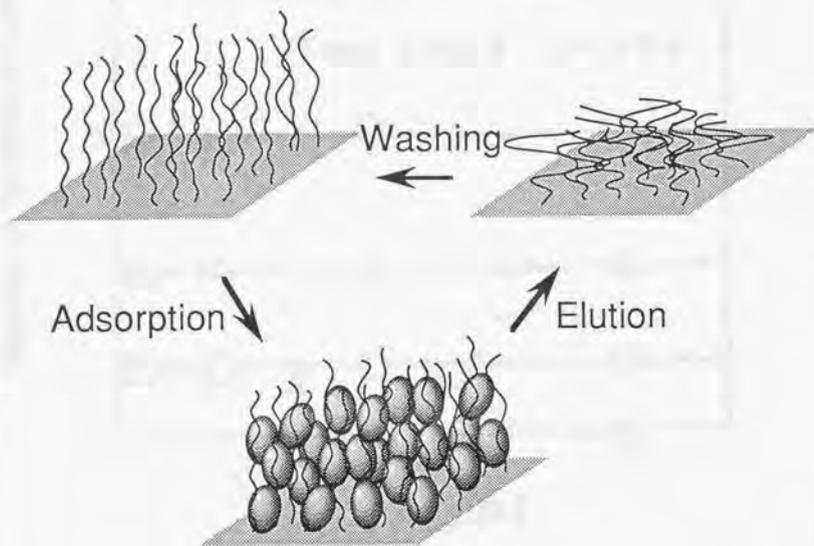
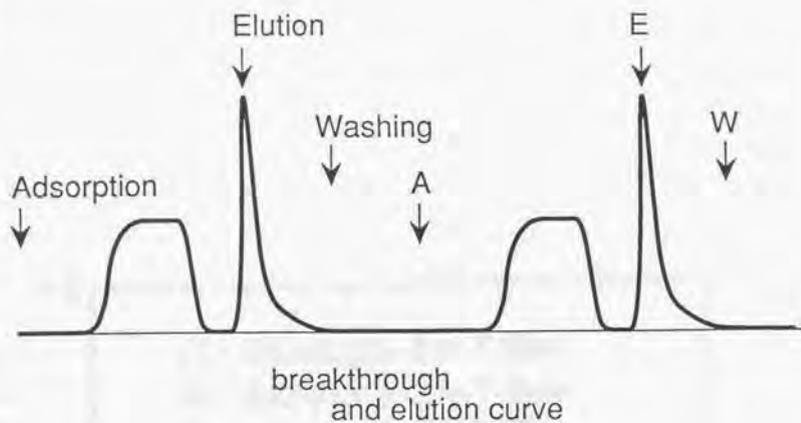


Fig. 6-4. Schematic illustrations of conformational change of grafted polymer chains during protein adsorption-elution-washing procedure.

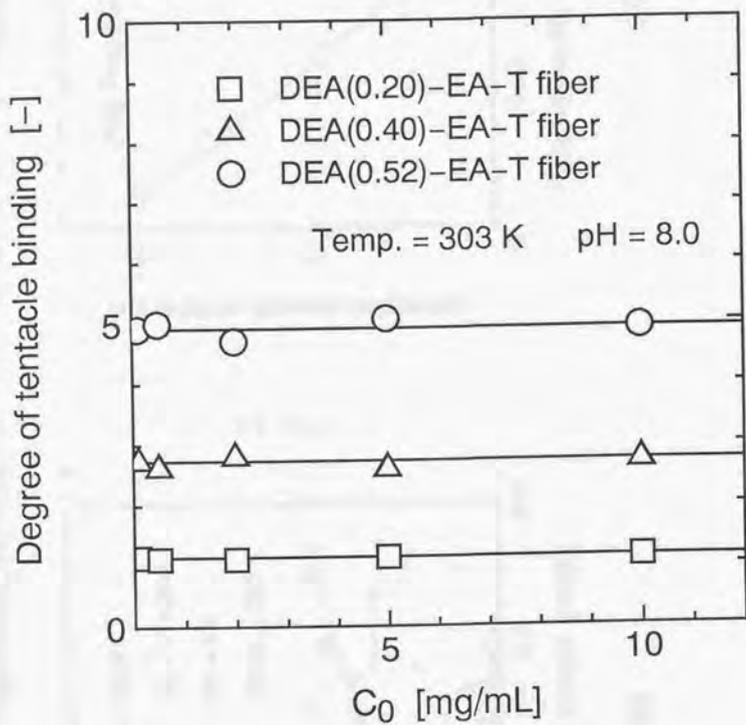


Fig. 6-5. Adsorption isotherms of BSA on the DEA-EA-T fibers.

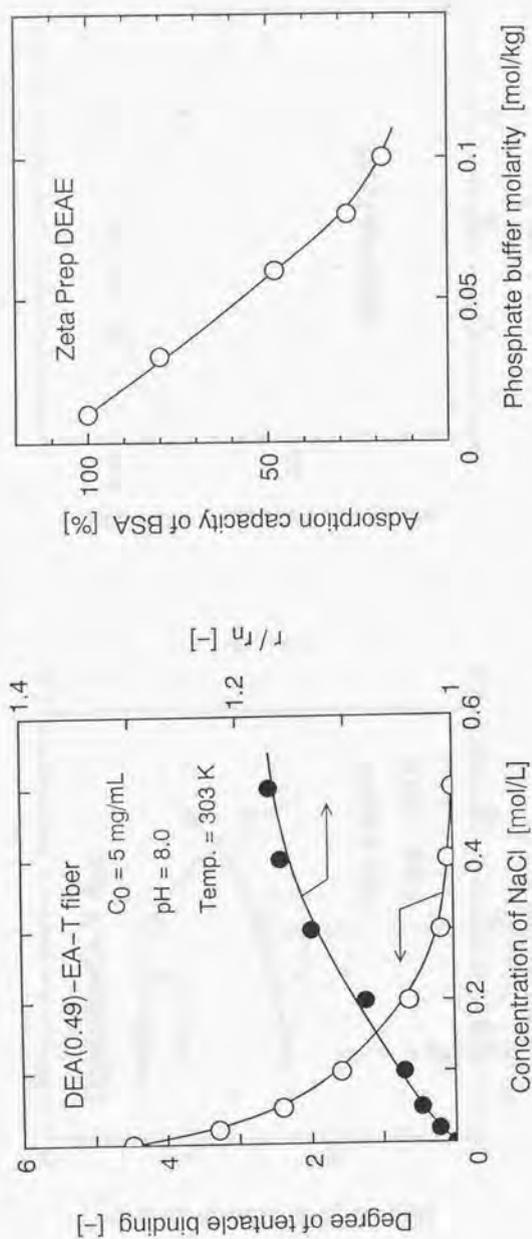


Fig. 6-6. (a) NaCl concentration effect on degree of tentacle binding of BSA and pore radius ratio of the DEA-EA-T fiber. (b) NaCl concentration effect on BSA adsorption capacity of the commercial anion exchanger (Zeta Prep DEAE).

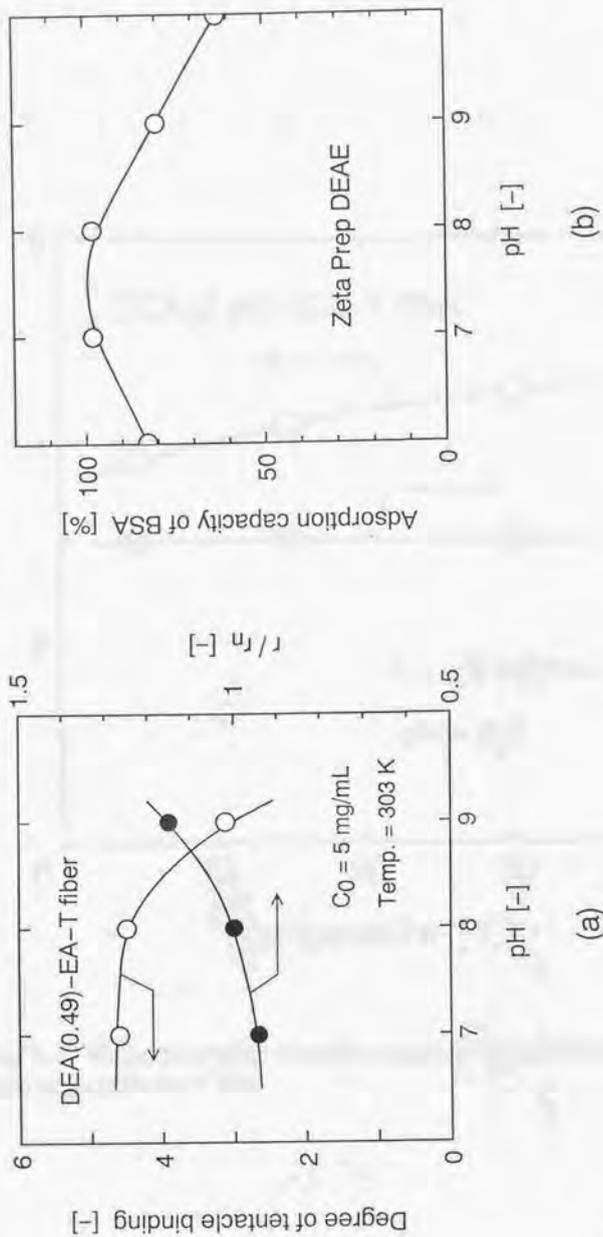


Fig. 6-7. (a) pH effect on degree of tentacle binding of BSA and pore radius ratio of the DEA-EA-T fiber. (b) pH effect on BSA adsorption capacity of the commercial anion exchanger (Zeta Prep DEAE).

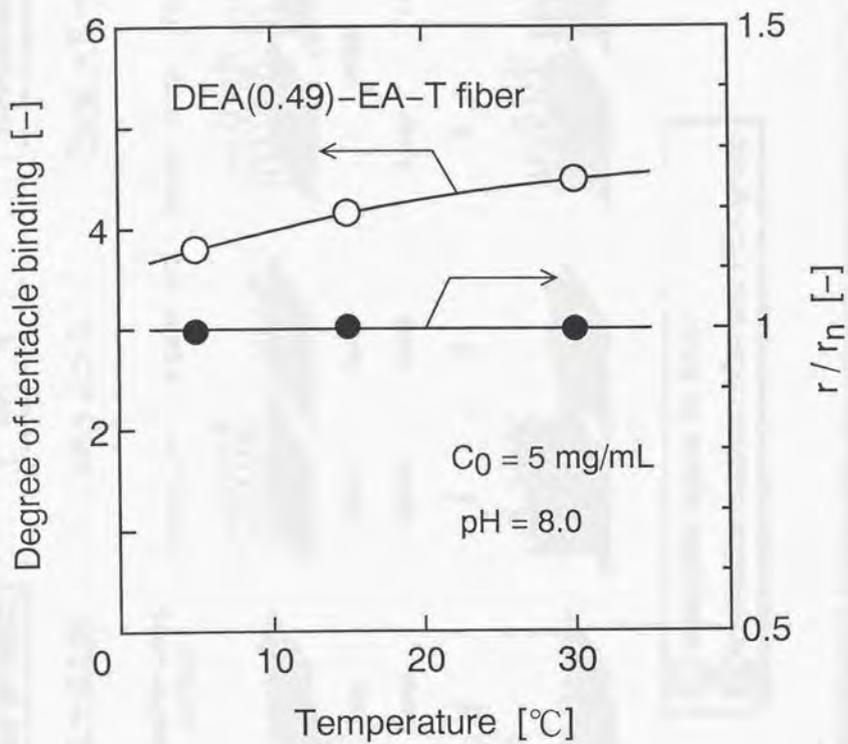


Fig. 6-8. Temperature effect on degree of tentacle binding of BSA and pore radius ratio of the DEA-EA-T fiber.

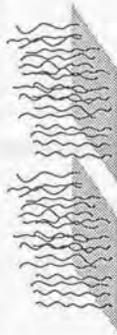
Concentration of NaCl

[NaCl] = 0 ~ 0.5 M

lower conc. of NaCl



higher conc. of NaCl



①
②

more

higher



less

lower



more

higher



less

lower



equal

lower ?



higher ?



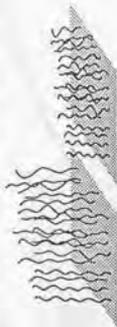
Temperature

Temp. = 5 ~ 30°C

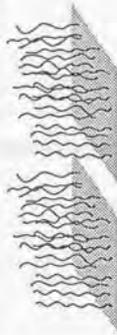
pH

pH = 7 ~ 9

lower pH



higher pH



- ① adsorption space for BSA
- ② interaction between BSA and DEA group

Fig. 6-9. Schematic illustrations of external condition effect on degree of tentacle binding to the DEA-EA-T fiber

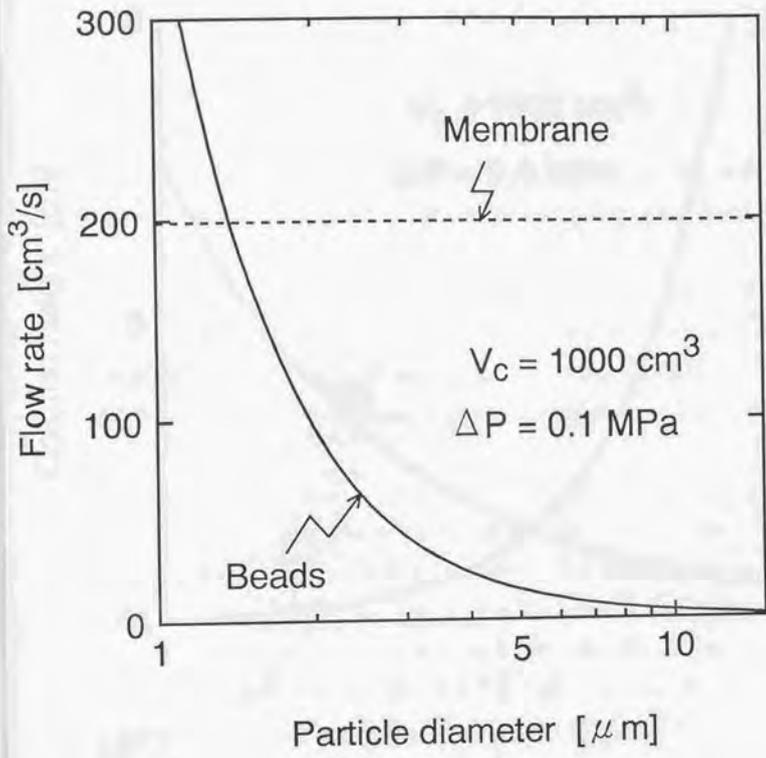


Fig. 6-10. Throughput rate of BSA with ion-exchange beads packed column as a function of particle diameter of the beads.

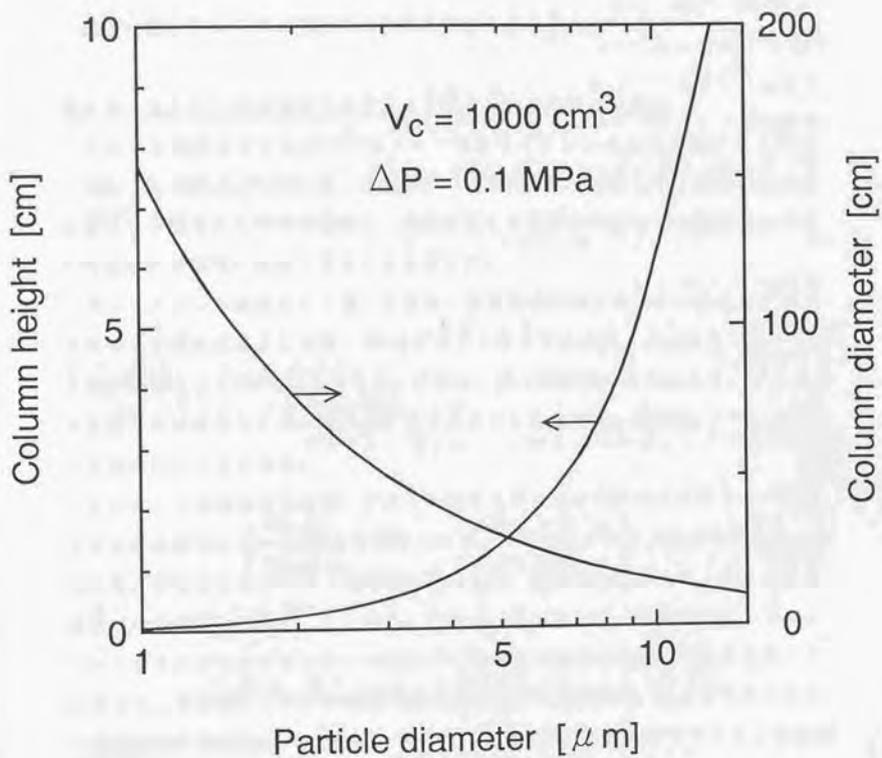


Fig. 6-11. Column height and diameter as a function of ion-exchange beads diameter for realizing the equivalent throughput rate of BSA to a DEA-EA-T fiber module.

第7章 本研究の総括と今後の展望

7-1 各章の要約

以下に第2章から第6章までの各章の内容をまとめた。

第2章 スルホン酸基を有するグラフト鎖の高分子基材への付与

スルホン酸基を有するビニルモノマーであるスチレンスルホン酸ナトリウム (SSS, $\text{CH}_2=\text{CHC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$) を、放射線グラフト重合法を適用して、汎用の高分子にグラフト重合する手法を提案し、用途に適した形状や材質をもつ強酸性カチオン交換材料を簡単に合成できることを示した。

ポリエチレンを基材として用いる場合、まず親水性モノマーを一段目にグラフト重合して膜を親水化した後、SSSをグラフト重合する手法、すなわち二段グラフト重合法によってSSSを導入できた。これは、膜の親水性の向上により、マトリクスを押し広げるように水が侵入し、ポリエチレン結晶表面へのSSSモノマーの拡散が促進されたからである。

さらに、この知見をもとに、アクリル酸やヒドロキシエチルメタクリレートのような親水性モノマーとSSSとを混合したモノマー中でグラフト重合反応をおこなう手法、すなわち共グラフト重合法を提案した。この手法によって、さまざまな形状（中空糸膜、不織布、フィルム）をもつポリエチレン、ポリプロピレンおよびテトラフルオロエチレンという高分子にスルホン酸基を容易に導入できることを示した。多孔性ポリエチレン製中空糸膜を基材にした場合、導入されたスルホン酸基量は 2.5mol/kg-product で、実用的に十分な交換容量を有するイオン交換体であった。

第3章 イオン交換基を有するグラフト鎖のコンフォメーションの実験的解明

多孔性膜に導入されたグラフト鎖のコンフォメーションは、グラフト鎖の性質（内部パラメータ）と透過溶液の性質（外部パラメータ）によって決まる。内部

パラメータとして、グラフト鎖の長さ、グラフト鎖密度および官能基密度がある。また、外部パラメータとして、溶媒の種類、pH、イオン強度および温度がある。

本章では、放射線グラフト重合法を適用して、多孔性ポリエチレン膜にグリシジルメタクリレート (GMA) をグラフト重合し、続くジエチルアミンとの反応でグラフト鎖中のエポキシ基をジエチルアミノ (DEA) 基 ($-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) に変換した。このとき、グラフト鎖密度を一定に保ち、グラフト鎖中エポキシ基からDEA基への転化率を変えることによって、DEA基密度 $0\sim 6.7$ [mol/kg-trunk polymer] を有する膜を得た。グラフト鎖が形成する部位は、膜の細孔表面部およびアモルファス内部に分類できる。細孔表面部に形成したグラフト鎖の伸縮挙動を膜の透水性能から推察し、また、アモルファス部内に形成したグラフト鎖の伸縮挙動を膜の体積膨張から推察した。

水およびアセトンを通じた膜を透過させたときの透過流束値をHagen-Poiseuilleの式に代入して、DEA基を有する膜の基材に対する細孔径の比 r/r_0 を求めた。水を透過させた場合、 r/r_0 は転化率40~60%で急激に減少し、転化率95%では0.33であった。これは、水中でDEA基が解離するために、細孔表面部のグラフト鎖が自身のもつ同種の正電荷の反発によって膨潤し、細孔を塞ぐからである。一方、アセトンを通じた場合、 r/r_0 の値は1~1.2を維持し、転化率にはほとんど依存しなかった。

膜の透水性能の測定から、さらにグラフト鎖のコンフォメーションを調べた結果、グラフト鎖は放射線架橋によってその伸長が制限されること、およびグラフト鎖の伸縮は可逆的に起こることがわかった。

第4章 スルホン酸基を有するグラフト鎖の金属イオンおよびタンパク質吸着特性

本章では、放射線グラフト重合法を適用して、多孔性ポリエチレン膜に3通りの反応経路でスルホン酸基を導入し、それぞれの膜の物性 (透水性能、比表面積およびイオン交換容量)、および金属イオン (銅イオン) とタンパク質 (リゾチーム) の吸着特性を調べ、比較した。

スチレンスルホン酸ナトリウム (SSS) をグラフト重合することによって得られる膜 (SSS膜とよぶ) の純水透過流束はほとんどゼロであった。一方、グリシジル

メタクリレート (GMA) をグラフト重合し、プロパンスルホンおよび亜硫酸ナトリウムとの反応によって得られるスルホン酸基を有する膜 (それぞれSP膜およびSS膜とよぶ) の場合は、GMAグラフト鎖中のエポキシ基からスルホン酸基への転化率を制御することによって膜の透過流束の低下を防ぐことができた。

SP膜の銅イオン吸着容量はスルホン酸基密度にほぼ比例したのに対し、リゾチーム吸着容量はスルホン酸基密度に依存せず、一定であった。これより、金属イオンに比べて分子量が高いタンパク質は、膜のアモルファス内部に侵入できないため、細孔表面部にあるグラフト鎖にのみ吸着し、その吸着容量は比表面積をタンパク質の占有面積で割りふって算出される単層吸着量に等しいことがわかった。これに対し、SS膜のリゾチーム吸着容量は、スルホン酸基密度の増加とともに増大し、多層吸着を起こすことがわかった。イオン交換基をもつ互いに架橋されていないポリマー鎖が、タンパク質に触毛 (Tentacle) のようにからみついて吸着する形態を見いだした。

第5章 イオン交換基を有するグラフト鎖へのタンパク質のTentacle吸着

放射線グラフト重合法を用いて、多孔性ポリエチレン製中空糸膜に、エポキシ基をもつ前駆体モノマーとしてグリシジルメタクリレート (GMA) をグラフト重合し、続くジエチルアミンとの反応でジエチルアミノ (DEA) 基を、亜硫酸ナトリウム (SS) との反応でスルホン酸基をそれぞれ導入した。さらに、タンパク質の非選択的吸着を抑制するために、残存するエポキシ基に水酸基を導入し、親水化した。得られた膜をそれぞれSS-Diol膜およびDEA-EA膜とよぶ。

それぞれの膜にリゾチームおよび牛血清アルブミン (BSA) 溶液を透過させ、その吸着容量を調べた結果、いずれもタンパク質を多層吸着するテントクル型イオン交換膜であることがわかった。膜の細孔表面にタンパク質が単層吸着したときの吸着量を基準にして、タンパク質の吸着層数 (テントクル結合度) を求めた。いずれの膜もグラフト鎖中のイオン交換基密度が大きいほどタンパク質のテントクル結合度は増大することがわかった。SS-Diol膜のリゾチーム吸着容量は最大で200g/kg、DEA-EA膜のBSA吸着容量は最大で490g/kgであり、いずれも単層吸着量の約11倍の吸着容量をもつことがわかった。

タンパク質の吸着にともなって細孔が埋められるために生じる膜の圧力損失を

Hagen-Poiseuille式を用いて推算し、実測値と比較した。その結果、タンパク質が膜の細孔壁からグラフト鎖に沿って最密充填的に近い形で吸着しているというモデルが妥当であることを実証した。さらに、SS-Diol膜およびDEA-EA膜は、タンパク質の種類や分子量によらず、テンタクル吸着を起こすことを確認した。

第6章 Tentacle吸着の物理化学的特性および実用性

本章では、ジエチルアミノ (DEA) 基を有するTentacle型アニオン交換膜 (DEA-EA膜) に牛血清アルブミン (BSA) を含む溶液をさまざまな条件下で透過させ、その吸着特性を調べるとともに、実用化への可能性について考察した。滞留時間 33~165sの範囲でBSAの破過曲線は滞留時間によらず一致し、BSAがDEA基に吸着されるまでの拡散移動抵抗が無視できることが示された。DEA-EA膜に吸着したBSAは100%回収することができ、グラフト鎖中の水酸基によってBSAの非選択的吸着が完全に抑制されていることがわかった。また、吸着と溶出操作を5回ずつ繰り返しても、膜の吸着性能は変化しなかった。BSA濃度0.2~10mg/mLの範囲で、DEA-EA膜のBSA平衡吸着量はBSA濃度によらず一定であり、低濃度の溶液中からもBSAを効率よく捕集できることを示した。

つぎに、膜に透過させる溶液の条件 (外部パラメータ) を変えたときにグラフト鎖のコンフォメーションが膜の吸着性能に及ぼす影響について調べた。pHおよびNaCl濃度の増加とともにグラフト鎖は収縮し、BSAの吸着量は低下した。

さらに、Tentacle型イオン交換膜 (DEA-EA膜) からなるモジュールと、従来のイオン交換ビーズを充填したカラムについて、タンパク質吸着処理速度の比較をおこなった。モジュール容積1000cm³、操作圧力0.1MPaという条件で、DEA-EA膜モジュールによる吸着処理速度は200cm³/sであると推算された。一方、イオン交換ビーズ充填カラムを用いてこの膜モジュールと同じ処理速度を得るためには、直径1.4mmのビーズを内径110cm、高さ0.10cmのカラムに充填する必要があり、工業化は困難であると判断した。以上の推算結果より、本研究で開発したTentacle型イオン交換膜を用いれば、従来のイオン交換体では実現できなかった高速、高容量分離が可能であることが確認された。

7-2 本研究の総括

放射線グラフト重合法を用いて、既存の高分子基材にイオン交換基を有するグラフト高分子鎖を導入し、新規の分離機能性材料を開発することを目的に研究をおこなった。まず、共グラフト重合法によって、イオン交換基を有するモノマーを基材にグラフト重合する新手法を提案し、従来のスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を母体とするイオン交換樹脂に比べて、穏和な反応条件で、簡単にイオン交換体を合成できることを示した。

つぎに、グラフト鎖のコンフォメーションが、得られる材料の分離機能に大きな影響を及ぼすと考え、多孔性基材の細孔にグラフト鎖を導入し、その透水性能を調べることによってグラフト鎖のコンフォメーションを推察した。グラフト鎖中のイオン交換基密度の増加とともに、透過流速は低下し、Hagen-Poiseuilleの式から算出される細孔径も減少した。これは、グラフト鎖中のイオン交換基が互いに反発し合うために、グラフト鎖が伸長し、細孔を塞いでいるためである。

伸長したグラフト鎖中のイオン交換基にタンパク質がイオン交換吸着するとき、その吸着容量は単層吸着量を越える値であることがわかった。これは、グラフト鎖が触毛 (Tentacle) のごとくタンパク質を包みこむような形で捕捉する (TENTAKUL 吸着) からである。これらの知見をもとに、多孔性 (Porous) 膜の細孔表面に、TENTAKUL (Tentacle) 吸着を発現するイオン交換性グラフト鎖を固定した材料を開発した。このような膜材料 (" Porous & Tentacle " 型イオン交換膜とよぶ) についてはこれまでのところ報告がない。この " Porous & Tentacle " 型イオン交換膜にタンパク質溶液を透過させると、タンパク質は対流に乗ってイオン交換基近傍まで輸送されるため、拡散移動抵抗が無視できることを実証した。また、タンパク質の吸着容量は膜の表面積に依存せず、イオン交換基密度の増加とともに増大することがわかった。さらに、膜に導入された親水基の効果でタンパク質の非選択的吸着が起こらないこと、および繰り返し使用が可能であることも確認された。これらの結果から、" Porous & Tentacle " 型イオン交換膜をモジュール化して利用すれば、従来のイオン交換ビーズ充填カラムでは実現が困難であったタンパク質溶液の高速、高容量吸着分離が可能になることがモデルを用いた推定により明らかになった。このように、放射線グラフト重合法を用いて、高性

能なタンパク質分離膜を開発したことが本研究の特色のひとつである。

本研究のもうひとつの特色は、溶媒およびタンパク質という2つのプローブを用いてグラフト高分子鎖のキャラクタリゼーションを間接的にこなったことである。水やアセトンの透過流速という「流動特性」から、あるいは、タンパク質溶液の透過に伴うイオン交換吸着という「物質移動特性」から、単離が困難なグラフト鎖のコンフォメーションを推察した。水とアセトンを交互に多孔性膜に透過させると、透過流速が可逆的に変化した。これより、イオン交換基を有するグラフト鎖の伸縮は可逆的であることがわかった。また、グラフト鎖中のイオン交換基密度が高くなると、グラフト鎖が互いに反発しあって伸びることを膜の透過流速およびタンパク質吸着容量の両面から確認した。本研究で合成した膜への牛血清アルブミン (BSA) の最大吸着量は単層吸着量の11倍である。タンパク質がグラフト鎖の間に入り込んで積み重なるとしたとき、BSA 11層分の厚みは約130nmであり、グラフト鎖の長さもこれと同程度であると推察できる。

7-3 今後の展望

本研究では単糸の膜に単成分のタンパク質を吸着させ、その吸着特性を調べてきた。しかしながら、実際のバイオプロダクトの分離精製に本研究で開発した膜を利用する場合、モジュール化した膜を用いて多成分のタンパク質を溶出分離する必要がある。イオン交換クロマトグラフィーにおいて最も一般的な溶出分離方法は、塩濃度上昇法、すなわち勾配法で塩濃度を連続的に高め、各タンパク質とイオン交換基との静電的相互作用の差を利用して溶出分離する方法である。今後は、モジュール化した膜に実用的に使われる多成分のタンパク質溶液を透過させる実験、そしてそのときグラフト鎖に固定するイオン交換基密度や溶出液の塩濃度勾配の傾きを調整することによって、最適な溶出分離条件を探る実験などが必要である。

本研究で開発した“Porous & Tentacle”型イオン交換膜は、酵素を大量に吸着でき、しかも吸着サイトがフレキシブルな高分子鎖であるために酵素活性を維持したまま吸着できると考えられる。したがって固定化酵素膜としての応用も期待

できる。また、抗原あるいは抗体をグラフト鎖に高密度に固定することによって、高性能イムノアッセイを実現できる可能性がある。

イオン交換基を有するグラフト鎖は、片端を固定された荷電基をもつ高分子鎖とみなすことができるので、両端が自由な高分子電解質と、両端が固定されたイオン性高分子ゲルとの間に位置づけられる。グラフト鎖のコンフォメーションについては、高分子物理のポリマーブラッシュ理論を用いた理論研究がさかんである。しかしながら、イオン交換基を有するグラフト鎖のポリマーブラッシュ理論は複雑であり、まだ始まったばかりである。本研究では、透水性能や吸着性能といったマクロな現象からグラフト高分子鎖のキャラクタリゼーションをおこなってきた。今後は、NMRや蛍光プローブ法を用いて、高分子のミクロな分子運動性を測定することによってグラフト鎖のキャラクタリゼーションをおこない、そこで得られる知見を活かして、さらに精密なグラフト鎖の制御にフィードバックすることが望まれる。

本研究の内容は以下の研究論文にまとめられている。

- 第2章 S.Tsuneda, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo, K.Makuuchi
Simple Introduction of Sulfonic Acid Group onto Polyethylene by
Radiation-Induced Cograftering of Sodium Styrenesulfonate with
Hydrophilic Monomers.
Ind. Eng. Chem. Res., **32**, 1464-1470 (1993)
- S.Sugiyama, S.Tsuneda, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo, K.Makuuchi
Attachment of Sulfonic Acid Group to Various Shapes of PE, PP and
PTFE by Radiation-Induced Graft Polymerization.
Reactive Polymers, **21**, 187-191 (1993)
- 第3章 S.Tsuneda, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo, I.Ishigaki
Water/Acetone Permeability of Porous Hollow-Fiber Membrane
Containing Diethylamino Group on the Grafted Polymer Branches.
J. Membrane Sci., **71**, 1-12 (1992)
- K.Kobayashi, S.Tsuneda, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo
Preparation of Microfiltration Membranes Containing Anion-Exchange
Group.
J. Membrane Sci., **76**, 209-218 (1993)
- 第4章 H.Shinano, S.Tsuneda, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo
Ion Exchange of Lysozyme during Permeation across a Microporous
Sulfopropyl-Group-Containing Hollow Fiber.
Biotechnol. Progress, **9**, 193-198 (1993)
- 第5章 S.Tsuneda, H.Shinano, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo
Binding of Lysozyme onto a Cation-Exchange Microporous Membrane
Containing Tentacle-Type Grafted Polymer Branches.
Biotechnol. Progress, **10**, 76-81 (1994)
- 第6章 S.Tsuneda, K.Saito, S.Furusaki, T.Sugo
High Throughput Processing of Proteins Using Microporous & Tentacle
Anion-Exchange Membrane.
submitted to *J. Chromatography*

謝辞

本研究は東京大学工学部化学生命工学科古崎研究室でおこなわれました。研究を進めるにあたってお世話になった方々に、この場を借りて感謝の意を表したいと思えます。

本研究を進めるにあたり、終始暖かく御指導下さいました古崎新太郎教授に心から感謝致します。

本研究全体を通じて斎藤恭一助教授には公私とも実に親身になって御指導していただきました。本当にありがとうございました。

本研究をまとめるにあたり、化学システム工学科の小宮山宏教授、中尾真一助教授、化学生命工学科の堀江一之教授、長棟輝行教授の諸先生方には、副査の立場から貴重な御教示と御助言をいただきました。厚く御礼を申し上げます。

日本原子力研究所高崎研究所照射利用開発室の須郷高信先生には、放射線照射、グラフト重合で大変お世話になりました。また、研究への多くの助言をいただきました。誠にありがとうございました。

日揮化学(株)の田中聰氏には、日夜にかかわらず、本研究の基礎となるグラフト重合法についての実験上の相談をこころよく受けていただきました。たいへんありがとうございました。

関実講師には、談話会のみならず実験室においても大変有意義なアドバイスをいただきました。貴志和之技官、倉田博之助手、武田俊哉助手には、談話会でたくさん鋭い質問をいただきました。

旭化成工業(株)には、基材の提供をはじめ、様々な実験に対して便宜をはかっていただきました。

試作室の黒木影康さんには、スポーツ活動をはじめとする生活面で激励をいただきました。

秘書の浜本美智子さんにはいろいろな励ましの言葉をいただきました。

古崎研究室の地下で6年の間に生活をともにした山岸秀之氏、金惣氏、上江洲一也氏、岩田秀樹氏、小西聡史君、科野宏典君、山田英夫君、戸井田康弘君、小林健次君、芹澤健一君、李国慶君、William Lee君、溝田智敏君、杉山慎君、関口浩二、小島淳君、香川浩哉君、伊藤正毅君、的場誠二君には大変お世話になりました。

日本原子力研究所高崎研究所の岡本次郎氏、石垣功氏、幕内恵三氏、片貝秋雄氏、吉田剛氏、菅野淳一氏には、研究への多くの助言をいただきました。

こうした方々をはじめとする様々な方々の協力と助力によって本研究を無事成就することができました。心から厚く感謝を申し上げます。

1994年6月

常田 聡





Kodak Color Control Patches

Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19



© Kodak, 2007 TM-Kodak